



**Maria Franco Portugal da Costa Romeu**

Licenciado em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Desenvolvimento de alimentos  
funcionais enriquecidos em polifenóis  
de azeitona**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Ana Vital Morgado Marques Nunes,  
Investigadora Auxiliar, FCT/UNL

Presidente: Prof. Doutor Mário Fernando José Eusébio  
Arguente(s): Prof. Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março 2016**

## **Direitos de cópia**

**Desenvolvimento de alimentos funcionais enriquecidos com polifenóis de azeitona**

**Copyright© 2016-** Maria Franco Portugal da Costa Romeu e Faculdade de Ciências e Tecnologia- Universidade Nova de Lisboa

Todos os direitos reservados

A Faculdade de Ciências Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## Agradecimentos

Esta tese de mestrado não seria possível sem a colaboração de muitas pessoas e instituição às quais gostaria de exprimir os meus agradecimentos:

À professora Ana Nunes por toda a dedicação, pelo apoio incondicional ao longo do percurso desta tese, transmissão de conhecimentos, conselhos e sugestões.

Ao professor Manuel Nunes da Ponte pela disponibilidade, por todo o apoio incondicional e transmissão de conhecimentos no decorrer deste trabalho.

À empresa AZAL pela grande contribuição ao gentilmente fornecer amostras das matérias primas e azeites para esta tese.

Ao Jorge pelo apoio e conhecimento na execução dos processos de nanofiltração, osmose inversa e pervaporação.

À dona Palminha por todo o apoio e companhia prestados no laboratório ao longo do decorrer deste trabalho.

Ao Nuno Costa por todo o apoio prestado e pela execução das análises em HPLC-UV.

À Rosário Bronze pela execução das análises HPLC-MS feitas na FF/UL.

Ao Professor Marco Silva e Davide por todo o apoio na área de Cromatografia Gasosa, por toda a disponibilidade e transmissão de conhecimentos prestada ao longo desta tese.

À Raquel pela disponibilidade prestada na execução da preparação da resina XAD4.

À professora Isabel Fonseca e à professora Maria por todos os conhecimentos transmitidos e disponibilidade prestada no que diz respeito à execução da adsorção em carvões ativados.

Aos meus pais por todo o apoio incondicional prestado ao longo deste percurso académico e pelo facto de me apoiarem em todas as minhas decisões. Sem eles muitos dos meus sonhos nunca se tornariam realidade.

Aos meus avós pelo apoio incondicional ao longo da minha vida académica.

Ao David e à Isabel por me terem apoiado sempre no desenvolvimento desta tese.

À Soraia, Mafalda e Rita pela amizade incondicional própria dos amigos que são para sempre.

Aos meus amigos pelo apoio, incentivo, compreensão e paciência.

A todos o meu sincero, **Muito obrigada!**



## Resumo

O trabalho desenvolvido nesta dissertação teve como principal objetivo o desenvolvimento de um azeite enriquecido em hidroxitirosol (HT), com uma quantidade mínima de 250 ppm, por forma a satisfazer a quantidade necessária para utilização da alegação de saúde recentemente aprovada pela EFSA.

Desta forma, estudaram-se vários parâmetros essenciais para a obtenção de um azeite enriquecido em HT utilizando um extrato natural: (i) a qualidade da matéria-prima, nomeadamente no que diz respeito ao seu teor em HT e aumento da produtividade do processo de nanofiltração, ii) o processo de incorporação do extrato aquoso no azeite, com e sem utilização de emulsionantes, bem como a estabilidade do azeite aditivado ao longo do tempo, iii) a eliminação de compostos voláteis, principalmente de ácido acético presente no extrato e responsável por um defeito descrito como “avinagrado-avinhado” em teste organoléticos efetuados ao azeite.

Os principais resultados apontam para uma importância decisiva do teor de HT da matéria-prima, na qualidade do produto final. Observou-se que uma campanha de azeite afetada por más condições climáticas e azeitonas sujeitas ao fungo gafa, origina uma matéria-prima com um teor em HT muito abaixo do teor normal. No entanto, utilizando um extrato concentrado, foi possível incorporar a quantidade de HT necessária a um azeite comercial, sem recorrer à utilização de emulsionantes. A concentração de HT no azeite aditivado manteve-se estável ao longo de aproximadamente 3 meses. Relativamente à existência de ácido acético no extrato, este composto foi removido com sucesso através de um processo de adsorção do extrato numa resina polimérica, com posterior dessorção utilizando etanol. O extrato submetido ao processo de adsorção, originou um azeite ainda com um moderado odor “avinhado”, mas completamente sem sabor.

**Palavras-Chave:** Hidroxitirosol, polifenóis, azeite, alegação de saúde, extrato, nanofiltração, adsorção.



## **Abstract**

The work performed in this dissertation aimed to develop a new olive oil rich in hydroxytyrosol (HT), with a minimum amount of 250 ppm, in order to meet the requirements that allows the utilization of the health claim recently approved by EFSA.

Therefore, several key parameters were studied in order to develop an olive oil enriched with a natural HT extract: i) the quality of olive oil by-products used as raw material, in particular as regards their content in HT and increased productivity of the nanofiltration process, ii) the process of incorporating the natural aqueous extract in olive oil, with and without the use of emulsifiers and its stability over time, iii) the elimination of volatile compounds, mainly acetic acid, present in the extract and responsible for a defect described as "vinegary-winey" in organoleptic tests performed to the olive oil.

Main results show a decisive importance of HT content in the raw material, on final product quality. It was observed that an olive oil campaign affected by bad weather conditions and olives subjected to the anthracnose fungus, yields a raw material with an HT content far below the normal level. However, using a concentrated extract, it was possible to incorporate the necessary amount of HT into a commercial olive oil, without the use of emulsifiers. HT concentration in the new olive oil remained stable over approximately 3 months. Concerning the existence of acetic acid in the extract, this compound was successfully removed by a process of adsorption of the extract into a polymeric resin, with subsequent desorption using ethanol. The extract subjected to the adsorption process, yielded an olive oil with a moderate smell "winey", but completely tasteless, when compared with the original product.

**Keywords:** Hydroxytyrosol, polyphenols, olive oil, health claim, extract, nanofiltration, adsorption.





## Índice

Índice de Figuras .....	XII
Índice de Tabelas .....	XII
1 Introdução.....	1
1.1 Hidroxitirosol- estrutura química e origem bioquímica .....	2
1.2 Relação entre variedades de azeitona e composição fenólica de azeites e de bagaços .....	3
1.3 Efeitos biológicos dos compostos fenólicos da azeitona e suas implicações para a saúde humana .....	8
1.4 Métodos de separação e concentração de hidroxitirosol e derivados .....	9
1.5 Formulação de azeites aditivados ricos em hidroxitirosol .....	10
Bibliografia.....	11
2 Materiais e métodos .....	15
2.1 Materiais .....	15
2.1.1 Bagaços de azeitona .....	15
2.1.2 Concentrados de osmose inversa (RO) .....	15
2.1.3 Azeites .....	16
2.1.4 Solventes, reagentes e padrões.....	16
2.2 Métodos .....	17
2.2.1 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em bagaços de azeitona.....	17
2.2.2 Nanofiltração de extrato de bagaço de azeitona- ensaios de laboratório.....	17
2.2.3 Osmose inversa de nanofiltrado da membrana NF270- ensaio de laboratório .....	20
2.2.4 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em concentrados de osmose inversa fornecidos pela AZAL .....	20
2.2.5 Evolução no tempo dos concentrados de osmose inversa .....	20
2.2.6 Evaporação de concentrados de osmose inversa e propriedades de concentrados de osmose inversa evaporados .....	21
2.2.7 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em concentrados de osmose inversa evaporados .....	22
2.2.8 Pervaporação de concentrados de osmose inversa evaporados .....	22
2.2.9 Adsorção de concentrados de osmose inversa e concentrados de osmose inversa evaporados em carvões ativados.....	23
2.2.10 Adsorção com resina XAD4 em concentrados de osmose inversa e concentrados de osmose inversa evaporados .....	23
2.2.11 Incorporação de concentrados de osmose inversa evaporados em azeites comerciais .....	24
2.2.12 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em azeites base e azeites aditivados .....	25
2.2.13 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol totais em azeites base e azeites aditivados .....	26
2.2.14 Cromatografia gasosa por <i>headspace</i> acoplada a espectrometria de massa.....	26
Bibliografia.....	28

3	Apresentação de resultados.....	29
3.1	Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres por HPLC em bagaços de azeitona	29
3.2	Nanofiltração de extrato de bagaço de azeitona- ensaios de laboratório .....	29
3.2.1	Permeabilidade hidráulica da Membrana NF270 .....	30
3.2.2	Permeabilidade hidráulica da Membrana DK.....	31
3.2.3	Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres durante o processo de nanofiltração .....	32
3.3	Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres durante o processo de osmose inversa do nanofiltrado da membrana NF270 .....	33
3.4	Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em concentrados de osmose inversa .....	33
3.4.1	Estudo da coloração dos concentrados de osmose inversa RO5, RO7 e RO8 .....	34
3.4.2	Estudo do odor em concentrados de osmose inversa .....	36
3.5	Evaporação de concentrados de osmose inversa .....	36
3.5.1	Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em concentrados de osmose inversa evaporados .....	37
3.5.2	Estudo da coloração e da desodorização de concentrados de osmose inversa RO8 evaporados .....	38
3.6	Azeites .....	45
3.6.1	Incorporação de concentrados de osmose inversa evaporados em azeites. ....	45
3.6.2	Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em azeites base e azeites aditivados não emulsionados .....	47
3.6.3	Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres feitas na FF/UL .....	50
3.6.4	Quantificação de hidroxitirosol e tirosol totais por HPLC em azeites base e azeites aditivados .....	51
3.6.5	Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em azeites aditivados emulsionados .....	52
3.6.6	Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em azeites incorporados com diferentes quantidades de concentrados de osmose inversa evaporados .....	54
3.6.7	Preparação de azeites aditivados para otimização da incorporação do concentrado de osmose inversa evaporado .....	55
3.6.8	Estudo da coloração e turvação de azeites aditivados .....	56
3.6.9	Azeite incorporado com evaporado em base de glicerol e com retentado .....	58
3.6.10	Cromatografia Gasosa por <i>headspace acoplado a espectrometria de massa</i> .....	59
4	Discussão de resultados .....	63
4.1	Qualidade do extrato rico em hidroxitirosol .....	63
4.1.1	Matéria-prima .....	63
4.1.2	Produtividade do processo: tecnologia de nanofiltração.....	65
4.1.3	Armazenamento de concentrado de osmose inversa.....	66
4.2	Azeite enriquecido em hidroxitirosol.....	68
4.2.1	Incorporação de concentrado de osmose inversa em azeite.....	68
4.2.2	Incorporação do evaporados sem utilização de emulsionantes: Quantificação de HT livre e HT total.....	70
4.2.3	Otimização e armazenamento em azeites aditivados.....	74

4.3	Desodorização do concentrado de osmose inversa .....	77
4.3.1	Neutralização química .....	78
4.3.2	Evaporação .....	78
4.3.3	Pervaporação .....	79
4.3.4	Adsorção com resina XAD4 .....	79
4.3.5	Quantificação de ácido acético e outros voláteis .....	83
Bibliografia.....		86
5 Conclusões.....		88
Anexos.....		91

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1-</b> Número de publicações científicas listadas na base de dados web of Science com a palavra-chave “hydroxytyrosol”.	1
<b>Figura 1.2-</b> Estrutura molecular do hidroxitirosol [By Edgar181 19:07, 17 April 2007 (UTC) - Own work, Public Domain, <a href="https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1962853">https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1962853</a> ].	2
<b>Figura 1.3-</b> Estrutura molecular do tirosol [By Benrr101 (Own work) [Public domain], via Wikimedia Commons].	2
<b>Figura 1.4—</b> Transcrição da figura 7 da referência [6], onde se apresentam esquemas de transformação química e bioquímica da oleuropeína durante os processos de maturação da azeitona e posterior processamento na produção de azeite virgem. R representa o hidroxitirosol.	7
<b>Figura 2.1-</b> Esquema de montagem da instalação utilizada para nanofiltração da fase aquosa do bagaço UCASUL Campanha 2013/2014.	18
<b>Figura 2.2-</b> Montagem de nanofiltração da fase aquosa do bagaço UCASUL Campanha 2013/2014.	19
<b>Figura 2.3-</b> Esquema para a obtenção dos principais produtos obtidos nesta tese.	27
<b>Figura 3.1-</b> Reator piloto para ensaiar malaxação do bagaço de azeitona.	30
<b>Figura 3.2-</b> Permeabilidade hidráulica para a membrana NF270 em função do tempo.	30
<b>Figura 3.3-</b> Permeabilidade hidráulica em função do fator de concentração para a membrana NF270.	31
<b>Figura 3.4--</b> Permeabilidade hidráulica em função do tempo para a membrana DK.	31
<b>Figura 3.5-</b> Permeabilidade hidráulica em função do fator de concentração para a membrana DK.	32
<b>Figura 3.6-</b> Amostras dos concentrados de osmose inversa RO5, RO6 e RO7.	33
<b>Figura 3.7-</b> Amostra do concentrado de osmose inversa RO8.	34
<b>Figura 3.8- a)</b> Amostras de concentrados de osmose inversa RO5 iniciais; <b>b)</b> Amostras de concentrados de osmose inversa RO5 finais.	35
<b>Figura 3.9- a)</b> Amostras de concentrado de osmose inversa RO7 iniciais; <b>b)</b> Amostras de concentrado de osmose inversa RO7 finais.	35
<b>Figura 3.3.10- a)</b> Amostras de concentrado de osmose inversa RO8 na fase inicial; <b>b)</b> Amostras de concentrado de osmose inversa RO8 na fase final.	36
<b>Figura 3.11-</b> Amostras dos concentrados de osmose inversa evaporados C822 e C823 (ver tabela 3.6).	39
<b>Figura 3.12-</b> Amostras de concentrados de osmose inversa RO8 evaporados em várias condições diferentes numa fase inicial.	40
<b>Figura 3.13-</b> Amostras de extratos de RO8 concentrados em várias condições diferentes na fase final.	40
<b>Figura 3.14-</b> Amostras de alguns concentrados de osmose inversa RO8 evaporados a diferentes temperaturas.	41
<b>Figura 3.15-</b> Azeite aditivado AZHT811 no início do estudo da coloração de um azeite aditivado.	56
<b>Figura 3.16-</b> Azeite aditivado AZHT811 no final do estudo da coloração de um azeite aditivado.	57
<b>Figura 3.17-</b> Azeite aditivado AZHT816 com e sem <i>molecular sieve</i> .	57
<b>Figura 3.18-</b> Cromatogramas de GC para a amostra de bagaço de azeitona AZAL Campanha 2015/2016 (cima) e concentrado de osmose inversa RO8 (baixo).	60
<b>Figura 3.19-</b> Cromatogramas de GC para o AZHT824 (cima), concentrado de osmose inversa RO8 (meio) e retentado CRet1 (baixo).	61
<b>Figura 3.20-</b> Cromatograma de GC para o concentrado de osmose inversa RO8 (cima) e para o evaporado dessorvido com etanol (incluindo a etapa de dessorção com água) (baixo).	61
<b>Figura 4.1-</b> Concentração de HT em mg/kg (ppm) de extratos obtidos a partir de bagaços referentes à campanha de 2014/2015 da AZAL (●) e UCASUL (Δ). As extrações foram efetuadas utilizando 20 g de bagaço e 13 ml de água durante 1 hora, à temperatura ambiente.	64

<b>Figura 4.2-</b> Concentração de HT em mg/kg (ppm) de extratos obtidos a partir de bagaços referentes à campanha de 2014/2015 e 2015/2016 recolhidos na empresa AZAL em Janeiro e Março. As extrações foram efetuadas utilizando 20 g de bagaço e 13 ml de água durante 1 hora, à temperatura ambiente. ....	65
<b>Figura 4.3-</b> Comparação de concentração de HT em mg/kg (ppm) da alimentação ao processo de nanofiltração e permeados obtidos utilizando membranas com diferentes massas molares de corte, NF270 (200-400 Da) e DK (150-300 Da). ....	66
<b>Figura 4.4- a)</b> Soluções de concentrado de osmose inversa RO7 no dia 28-09-15; <b>b)</b> Soluções de concentrado de osmose inversa RO7 no dia 29-09-15; <b>c)</b> Soluções de concentrado de osmose inversa RO7 no dia 01-10-15; <b>d)</b> Soluções de concentrado de osmose inversa RO7 no dia 02-10-2015. ....	67
<b>Figura 4.5-</b> Concentração de HT em mg/kg (ppm) de azeites preparados por incorporação de concentrado de osmose inversa evaporado (C88) utilizando como emulsionante span 20 em diferentes razões mássicas emulsionante:concentrado de osmose inversa. ....	69
<b>Figura 4.6-</b> Concentração de HT em mg/kg (ppm) de azeites preparados por incorporação de concentrado de osmose inversa (C823) utilizando como emulsionante span 20 e GMO em diferentes razões mássicas emulsionante:concentrado de osmose inversa. ....	70
<b>Figura 4.7-</b> Concentração em mg/kg (ppm) de hidroxitirosol, tirosol e compostos derivados num azeite comercial e no mesmo azeite comercial aditivado por incorporação de 1% (m/m) de um extrato natural concentrado (C59) sem utilização de emulsionantes. ....	71
<b>Figura 4.8-</b> Concentrações corrigidas em mg/kg (ppm) de hidroxitirosol, tirosol e compostos derivados num azeite comercial e no mesmo azeite comercial aditivado por incorporação de 1% (m/m) de um extrato natural concentrado (C59) sem utilização de emulsionantes. ....	72
<b>Figura 4.9-</b> Concentração em mg/kg (ppm) para o azeite aditivado (AZHT15). HT livre: símbolos vazios azuis, HT e compostos derivados: símbolos cheios vermelhos, HT+ Ty e compostos derivados: símbolos com padrão verdes. Os símbolos em forma de triângulo representam medidas feitas por HPLC-MS na Faculdade de Farmácia. Os círculos representam medidas feitas por HPLC-UV no laboratório de análises do REQUIMTE. O azeite aditivado foi preparado por incorporação de 1% (m/m) de um extrato natural concentrado (C59) sem utilização de emulsionantes. ....	73
<b>Figura 4.10-</b> Evolução das repetições do azeite aditivado AZHT15 comparativamente ao próprio AZHT15. Legenda: Quadrado azul- AZHT15; triângulo verde- AZHT81; cruz roxa: AZHT82 bola laranja: AZHT83. ....	75
<b>Figura 4.11-</b> Evolução de HT livre do azeite aditivado AZHT15 na condição de armazenamento à luz e ao ar (série azul) e no frigorífico (série vermelha). ....	77
<b>Figura 4.12-</b> Resultados obtidos para duas experiências similares de adsorção. Massa total de HT (mg) na alimentação, massa total de HT (mg) no rejeitado e massa total de HT (mg) que foi adsorvido na resina. Para ambas os casos, a experiência realizou-se com 35 mL de alimentação (RO8), 120 g de resina/L extrato, durante 3 horas à temperatura ambiente. ....	80
<b>Figura 4.13-</b> Percentagem de recuperação do HT adsorvido na resina utilizando diferentes métodos: i) dessorção em dois passos foi efetuada primeiro com água e depois com etanol, ii) dessorção apenas num passo foi efetuada apenas com etanol. A experiência de dessorção foram ambas realizadas utilizando 35 mL de solvente durante 3 horas à temperatura ambiente. ....	81
<b>Figura 4.14-</b> Otimização do passo de adsorção de HT na resina, utilizando diferentes quantidades de resina, diferentes temperaturas e diferentes tempos de adsorção. ....	81
<b>Figura 4.15-</b> Massa total de HT (mg) na alimentação, massa total de HT (mg) no rejeitado e massa total de HT (mg) que foi adsorvido na resina. A experiência realizou-se com 35 mL de alimentação (RO8), 240 g/L de resina, durante 3 horas à temperatura ambiente. A dessorção de HT foi efetuada em dois passos com água e etanol. ....	82
<b>Figura 4.16-</b> Comparação de ensaios de adsorção efetuados para o concentrado da osmose inversa e para o concentrado da osmose inversa evaporado com uma concentração em HT aproximadamente 10 vezes mais elevada. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições 35 mL de alimentação, 120g/L de resina, à temperatura ambiente durante 3 horas. ....	83
<b>Figura 4.17-</b> Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanoico, creosol e 4-etilfenol na alimentação (azul), rejeitado (vermelho), extrato dessorvido com água (roxo) e extrato dessorvido com etanol (verde) Os ensaios foram realizados utilizando 35 mL de alimentação, 120 g/L de resina, à temperatura ambiente durante 3 horas. As dessorções efetuaram-se utilizando 35 mL de solvente. ....	84

**Figura 4.18-** Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol na alimentação (azul), rejeitado (vermelho) e concentrado dessorvido com etanol (verde) Os ensaios foram realizados utilizando 35 mL de alimentação, 120 g/L de resina, à temperatura ambiente durante 3 horas. A dessorção efetuou-se apenas num passo utilizando 35 ml de etanol. .... 84

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.1-</b> Concentrações efetivas EC50 de meia redução do radical DPPH (em 15 min), de vários antioxidantes, transcritas da referência [4].	1
<b>Tabela 1.2-</b> Transcrição parcial da tabela 1 da referência [5], onde se indicam os nomes correntemente utilizados na literatura especializada, os nomes químicos, a fórmula química, a massa molar e a estrutura química de alguns dos principais conjugados fenólicos da azeitona.	5
<b>Tabela 2.1-</b> Todos os solventes, reagentes e padrões utilizados neste trabalho.	16
<b>Tabela 2.2-</b> Especificações técnica das membranas NF270 e DK.	18
<b>Tabela 3.1-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para os bagaços de azeitona.	29
<b>Tabela 3.2-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para as diferentes fases do processo de nanofiltração de extrato de bagaço de azeitona.	32
<b>Tabela 3.3-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para as diferentes fases do processo de osmose inversa do nanofiltrado da membrana NF270.	33
<b>Tabela 3.4-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para os concentrados de osmose inversa RO5, RO6, RO7 e RO8.	34
<b>Tabela 3.5-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para a adsorção com carvões ativados no concentrado de osmose inversa RO8.	36
<b>Tabela 3.6-</b> Modo de preparação de amostras de concentrado de osmose inversa evaporados.	37
<b>Tabela 3.7-</b> Quantificação de HT livre por HPLC para os concentrados de osmose inversa RO5 evaporados.	38
<b>Tabela 3.8-</b> Quantificação de HT livre por HPLC para o concentrado de osmose inversa RO6 evaporado.	38
<b>Tabela 3.9-</b> Quantificação de HT livre por HPLC para o concentrado de osmose inversa RO7 evaporado.	38
<b>Tabela 3.10-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para os concentrados de osmose inversa RO8 evaporados.	38
<b>Tabela 3.11-</b> Valores de pH medidos em vários concentrados de osmose inversa RO8 evaporados.	41
<b>Tabela 3.12-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para a pervaporação do concentrado de osmose inversa RO8 evaporado.	42
<b>Tabela 3.13-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para a adsorção com carvões ativados do concentrado de osmose inversa RO8 evaporado.	42
<b>Tabela 3.14-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC de concentrado de osmose inversa RO8 por adsorção com resina XAD4.	43
<b>Tabela 3.15-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC de concentrado de osmose inversa por adsorção com resina XAD4 sem o passo de dessorção com água.	43
<b>Tabela 3.16-</b> Quantificação de HT e Ty livres de concentrado de osmose inversa da otimização da adsorção com resina XAD4.	43
<b>Tabela 3.17-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC de concentrado de osmose inversa RO8 para a condição otimizada de adsorção com resina XAD4 dobro da resina com o passo de dessorção de água.	44
<b>Tabela 3.18-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC de concentrado de osmose inversa RO8 para as condições otimizadas de adsorção com resina XAD4 sem o passo de dessorção de água.	44
<b>Tabela 3.19-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para a adsorção com resina XAD4 em concentrado de osmose inversa evaporado com o passo de dessorção com água.	45
<b>Tabela 3.20-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para a adsorção com resina XAD4 em concentrado de osmose inversa evaporado sem o passo de dessorção com água.	45
<b>Tabela 3.21-</b> Modo de preparação da incorporação de concentrados de osmose inversa em azeites aditivados.	45
<b>Tabela 3.22-</b> Modo de preparação da incorporação de concentrados de osmose inversa em azeites aditivados emulsionados.	47
<b>Tabela 3.23-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para os azeites base.	48
<b>Tabela 3.24-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para o azeite aditivado AZHT15.	48
<b>Tabela 3.25-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para o azeite aditivado AZHT15 que esteve no frigorífico.	49
<b>Tabela 3.26-</b> Data de reproduções do azeite aditivado AZHT15.	49

<b>Tabela 3.27-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para os azeites aditivados que serviram de reprodução do azeite AZHT15.....	49
<b>Tabela 3.28-</b> Identificação de cada composto e respetiva área do pico (U.A.) feita na FF/UL.....	50
<b>Tabela 3.29-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC-MS feito na FF/UL. ....	50
<b>Tabela 3.30-</b> Comparação de resultados obtidos na FCT/UNL e na FF/UL. ....	51
<b>Tabela 3.31-</b> Quantificação de HT e Ty totais por HPLC-MS feita na FF/UL. ....	51
<b>Tabela 3.32-</b> Quantificação de HT e Ty totais por HPLC-MS resumidos feitos na FF/UL.....	52
<b>Tabela 3.33-</b> Quantificação de HT e Ty totais por HPLC para os azeites AZHT15 e AZHT81.....	52
<b>Tabela 3.34-</b> Data de preparação e incorporação em azeites aditivados emulsionados .....	53
<b>Tabela 3.35-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para azeites aditivados emulsionados.....	53
<b>Tabela 3.36-</b> Data de preparação e de azeites aditivados incorporados com diferentes quantidades de evaporados.....	54
<b>Tabela 3.37-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para azeites aditivados incorporados com diferentes quantidades de concentrados de osmose inversa evaporados. ....	54
<b>Tabela 3.38-</b> Azeites aditivados preparados para otimização da incorporação do concentrado de osmose inversa RO8 evaporado. ....	55
<b>Tabela 3.39-</b> Temperatura atingida no final da incorporação em azeites aditivados.....	55
<b>Tabela 3.40-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC de azeites aditivados para otimização da incorporação do concentrado de osmose inversa evaporado. ....	56
<b>Tabela 3.41-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para o azeite AZHT816 com <i>molecular sieve</i> . ....	58
<b>Tabela 3.42-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para o azeite aditivado AZHT821.....	58
<b>Tabela 3.43-</b> Data de preparação de azeites aditivados com retentados. ....	59
<b>Tabela 3.44-</b> Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para azeites incorporados com retentados.....	59
<b>Tabela 3.45-</b> Amostras analisadas em GC por headspace. ....	59
<b>Tabela 4.1-</b> Resumo das experiências de evaporação dos concentrados da osmose inversa evaporados realizadas a diferentes temperaturas. ....	78
<b>Tabela 4.2-</b> Comparação da percentagem de recuperação de HT adsorvido na resina com a percentagem de eliminação de alguns dos compostos voláteis existentes no concentrado e identificados e quantificados por GC.....	85



## **Lista de abreviaturas**

AZAL Arb- Azeite AZAL Arbequina

AZAL BIO- Azeite AZAL BIO não filtrado

AZAL GAL- Azeite AZAL Galega

AZDIA- Azeite Dia Virgem Extra

AZHT- azeite aditivado

AZOLS- Azeite Oliveira da Serra Virgem Extra Clássico

GC-Cromatografia gasosa

GMO- Gliceril monooleato

HPLC-MS- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa

HPLC-UV- Cromatografia líquida de alta eficiência

HT- Hidroxitirosol

NaOH- Hidróxido de sódio

NF- Nanofiltrado

Cperm- evaporado permeado

CRet- evaporado retentado

RO5- Concentrado da osmose inversa nº5

RO6- Concentrado da osmose inversa nº6

RO7- Concentrado da osmose inversa nº7

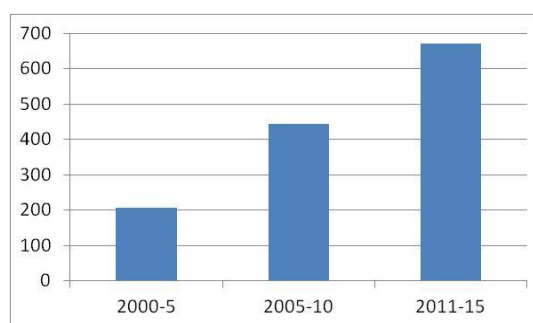
RO8- Concentrado da osmose inversa nº8

Ty-Tirosol



## 1 Introdução

Uma busca efetuada na conhecida base de dados de publicações científicas web of Science, com a palavra chave “hydroxytyrosol”, verifica que nos quinquênios sucessivos 2001-2005, 2006-2010 e 2011-2015 estão registadas, respetivamente, 206, 444 e 671 publicações, das quais 152 só no ano de 2015.



**Figura 1.1-** Número de publicações científicas listadas na base de dados web of Science com a palavra-chave “hydroxytyrosol”.

Este interesse linearmente crescente das comunidades científica e tecnológica pelo hidroxitirosol é resultado da sua identificação como um dos componentes-chave do azeite, a gordura típica da famosa dieta mediterrânica. Na realidade, já nas duas últimas décadas do século passado, o hidroxitirosol foi referenciado como um poderoso antioxidante natural, largamente responsável, nas suas formas livre ou combinadas, pela estabilidade oxidativa dos azeites [1-3] mas também como inibidor in vitro da oxidação das partículas de LDL (o transportador de colesterol também conhecido como o “mau colesterol”) [1] e como sequestrante (“scavenger”) de radicais livres [5]. Como exemplo, apresentam-se na tabela 1.1 resultados da referência [4] de capacidade de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por vários antioxidantes, expressos em termos da concentração de antioxidante que reduz a metade a concentração de radicais ao fim de 15 min. A superioridade do hidroxitirosol sobre outros antioxidantes conhecidos é evidente.

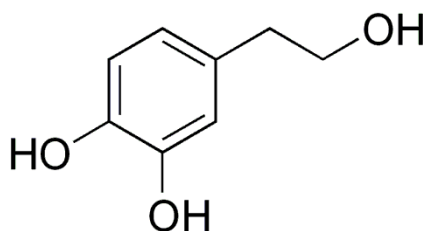
**Tabela 1.1-** Concentrações efetivas EC50 de meia redução do radical DPPH (em 15 min), de vários antioxidantes, transcritas da referência [4].

Composto	EC50 / M
Vitamina C	$1.31 \times 10^{-5}$
Vitamina E	$5.04 \times 10^{-6}$
BHT	$1.05 \times 10^{-4}$
Hidroxitirosol	$2.60 \times 10^{-7}$
Oleuropeína	$3.63 \times 10^{-5}$

O valor económico potencial destas propriedades, que podem ter importantes implicações na prevenção de doenças de larga incidência e morbilidade, como as doenças cardiovasculares e o cancro, constituíram os principais motores do interesse acima referido. As publicações representadas na figura 1.1 começaram por se centrar nos efeitos antioxidantes, mas evoluíram para uma série de áreas que serão descritas a seguir: (i) a química/bioquímica de formação de hidroxitirosol na azeitona, as formas sob as quais aparece, isto é, as moléculas a que se liga quimicamente, as famílias químicas similares, como a do tirosol, e a evolução destas moléculas nos processos de maturação da azeitona, de produção de azeite e de bagaço de azeitona; (ii) a relação entre variedades de azeitona e composição de azeites e de bagaços e a sua evolução no tempo; (iii) os efeitos biológicos destas famílias moleculares, as suas implicações para a saúde humana, incluindo testes clínicos e estudos em animais; (iv) os métodos e técnicas de separação deste tipo de compostos a partir de produtos da oliveira, como azeitonas, azeites, bagaços, folhas; (v) a incorporação de concentrados destas substâncias em azeites.

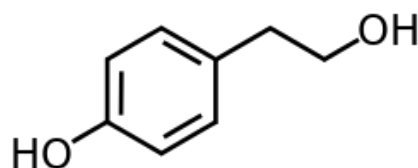
## 1.1 Hidroxitirosol- estrutura química e origem bioquímica

O hidroxitirosol, cuja estrutura é representada na figura 1.2 (nome IUPAC 4-(2-hidroxietil)-1,2-benzenodiol e também conhecido na literatura especializada como 3,4-DHPEA ou álcool 3,4-dihidroxifeniletílico), é um álcool que aparece carateristicamente na azeitona e noutros produtos da oliveira, livre ou combinado com uma variedade de outros produtos naturais, através de ligações do tipo éster.



**Figura 1.2-** Estrutura molecular do hidroxitirosol [By Edgar181 19:07, 17 April 2007 (UTC) - Own work, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1962853>].

Outro álcool similar e igualmente abundante na azeitona é o tirosol (4-(2-hidroxietil)fenol, também designado por p-HPEA ou álcool p-hidroxifeniletílico).



**Figura 1.3-** Estrutura molecular do tirosol [By Benrr101 (Own work) [Public domain], via Wikimedia Commons].

Obied et al. [6] reviram os estudos dos mecanismos biossintéticos que conduzem à formação da grande variedade de moléculas em que estes dois álcoois aparecem nos produtos da árvore *Olea europaea*, a comum oliveira. Estes álcoois fenólicos aparecem conjugados sob a forma de ésteres do ácido elenólico, um ácido terpénico pertencente à família dos secoiridóides. Segundo os autores, os conjugados fenólicos mais importantes na oliveira são a oleuropeína e o ligustrosídeo, que são ésteres, respetivamente, do hidroxitirosol e do tirosol, ligados ao ácido elenólico e a uma molécula de glucose. Estes conjugados fenólicos principais dão origem a uma série de derivados importantes. Nas duas páginas seguintes transcreve-se (muito parcialmente) a tabela 1 da referência [6], que indica o nome corrente, o nome químico, a fórmula química, a massa molar e a estrutura química de alguns destes compostos. Os compostos listados na tabela 1.2 constituem só uma pequena parte do grande número de compostos já identificados e referidos em [6], mas dá já uma ideia da complexidade envolvida nos estudos destes produtos naturais.

Na figura 1.4, transcreve-se a figura 7 da mesma referência, onde se representa a enorme teia de transformações químicas que pode sofrer a oleuropeína, a principal molécula contendo hidroxitirosol, durante a maturação da azeitona e o seu posterior processamento para dar origem aos seus principais produtos, o azeite virgem e o bagaço de azeitona. Esta evolução química, tanto para os derivados da oleuropeína (éster de hidroxitirosol) como para os do ligustrosídeo (éster de tirosol), é sobretudo consequência de atividade enzimática e pode conduzir a produtos de hidrólise, em que o hidroxitirosol e o tirosol livres são os produtos últimos, ou de oxidação. Há um elevado número de estudos nesta área, dirigidos sobretudo para evolução de azeites em condições de armazenamento normais ou em que se induz transformação acelerada. Um exemplo recente é o artigo de Kotsiou e Tasioula-Margari. [7]

## **1.2 Relação entre variedades de azeitona e composição fenólica de azeites e de bagaços**

A composição fenólica de azeitonas, azeite (o produto de valor económico largamente dominante na fileira agronómica da oliveira) e do bagaço de azeitona (subproduto resultante da produção de azeite) tem sido, tal como foi visto no sub-capítulo anterior, exaustivamente estudada. Artigos de revisão recente cobrem a composição de azeitonas de mesa [8], e de bagaços e outros resíduos [9]. A composição fenólica dum grande número de variedades plantadas em Portugal foi estudada extensivamente por Vinha et al. [10].

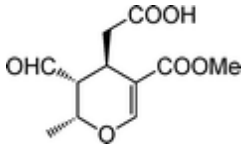
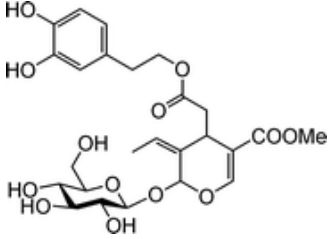
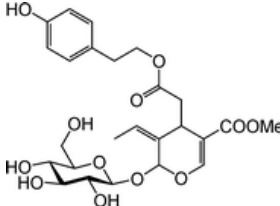
A principal conclusão é a da grande variabilidade dos perfis medidos, que são altamente dependentes de fatores climáticos e de solo locais, assim como das diferentes variedades de oliveira. No caso dos azeites, as significativas transformações químicas e a atividade enzimática induzidas pelos processos de maceração da azeitona, mistura com água, compressão, centrifugação, complicam ainda mais a interpretação das diferenças detetadas

nas composições fenólicas. Podem, por exemplo, comparar-se as conclusões de três artigos recentes, que examinaram a composição de azeites obtidos a partir de diversas azeitonas espanholas, incluindo as variedades Arbequina e Picual. Enquanto os artigos de Franco et al. [11] e de Reboredo-Rodríguez et al. [12] concluem que a variedade Arbequina é muito menos rica que a Picual em hidroxitirosol e seus derivados, o trabalho analítico de Sánchez de Medina et al. [13] deteta em azeites monovariais de Arbequina concentrações muito mais elevadas de derivados de hidroxitirosol do que para todos os outros azeites estudados, incluindo os de Picual.

Estes resultados são bem indicativos da complexidade dos perfis fenólicos e testemunham as possibilidades de rápidas e diferentes evoluções com o tempo. Na referência [8], são indicados três períodos de variação do conteúdo de oleuropeína nas azeitonas, sendo o primeiro de aumento durante o crescimento do fruto, e os dois seguintes de diminuição progressiva, correspondendo à maturação do fruto, primeiro verde e depois negra. O índice de maturação do fruto na altura de processamento para produzir azeite pode portanto ser determinante.

Por outro lado, as variações climáticas de ano para ano, que produzem grandes variações na produtividade das oliveiras em termos de quantidade total de fruto, e portanto do azeite produzido, também influenciam de modo decisivo a quantidade de fenóis na azeitona. De modo geral, são reportadas menores concentrações de fenólicos em anos de menor produtividade. Por outro lado, as lesões externas nas azeitonas provocadas, por exemplo, por ataques de insetos, para além de resultarem em menores produtividades, desencadeiam atividades enzimáticas que conduzem a uma degradação mais rápida dos compostos fenólicos no próprio fruto, daí resultando também menores quantidades nos azeites e nos bagaços.

**Tabela 1.2-** Transcrição parcial da tabela 1 da referência [5], onde se indicam os nomes correntemente utilizados na literatura especializada, os nomes químicos, a fórmula química, a massa molar e a estrutura química de alguns dos principais conjugados fenólicos da azeitona.

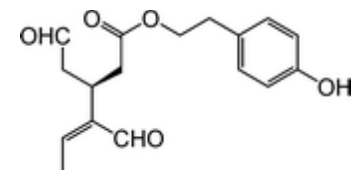
Nome Comum	Nome Químico	Fórmula Química	PM	
Ácido elenólico	(2S,3S,4S)-3-Formil-5-(metoxicarbonil)-2-metil-3,4-dihidro-2H-piran-4-ácido acético	$C_{11}H_{14}O_6$	242	
Oleuropeína	(2S,3E,4S)-3-Etilideno-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-5-(metoxicarbonil)-2H-piran-4-ácido acético 2-(3,4-dihidroxifenil) etil éster	$C_{25}H_{32}O_{13}$	540	
Ligustroside	(2S,3E,4S)-3-Etilideno-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-5-(metoxicarbonyl)-2H-piran-4-ácido acético 2-(4-hidroxifenil) etil éster	$C_{25}H_{32}O_{12}$	524	

Oleocantal (4-HPEA-EDA) (Forma dialdeído descaboximetil da aglicone ligustroside)

4-Formil-3-(2-oxoetil)-4-ácido hexenóico 2-(4-hidroxifenil) etil éster

$C_{17}H_{20}O_5$

304

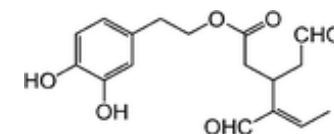


3,4-DHPEA-EDA (Forma dialdeído descaboximetil da aglicone oleuropeína)  
(4- Aglicone noroleuropeína)

4-Formil-3-(2-oxoetil)-2-(3,4-dihidroxipfenil) etil-4-ácido hexenóico éster

$C_{17}H_{20}O_6$

320

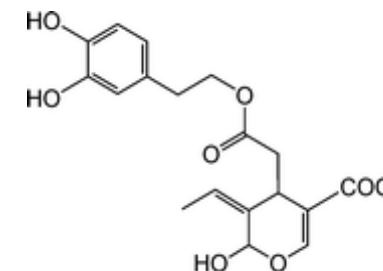


Aglicone  
oleuropeína

(2*R*,3*E*,4*S*)-3-Etilideno-3,4-dihidro-2-hidroxi-5-(metoxicarbonil)-2*H*-piran-4-ácido acético 2-(3,4-dihidroxifenil)etil éster

$C_{19}H_{22}O_8$

378





**Figura 1.4**– Transcrição da figura 7 da referência [6], onde se apresentam esquemas de transformação química e bioquímica da oleuropeína durante os

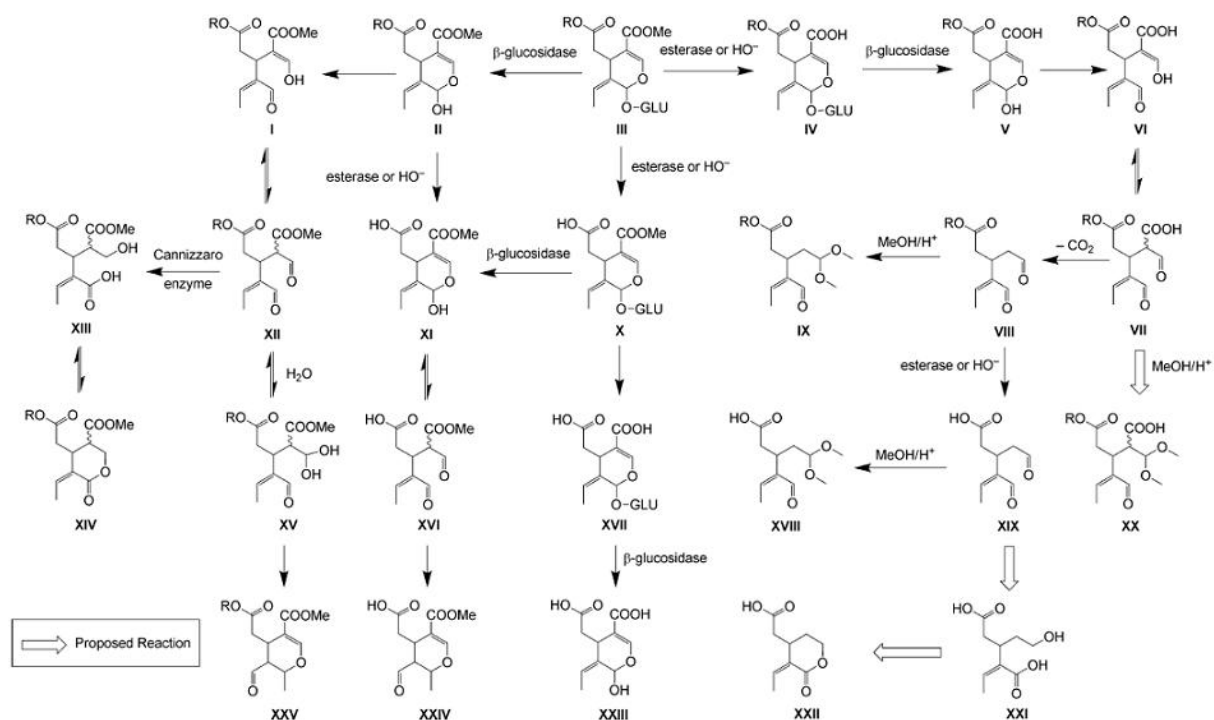


Fig. 7 Biotransformations of oleosides as illustrated for oleuropein (R = hydroxytyrosol) during maturation (biotransformation), processing, extraction, and sample handling. Compounds are identified as follows: (I) oleuropein dialdehyde, enol form, (II) oleuropein aglycon, (III) oleuropein, (IV) demethyloleuropein, (V) demethyloleuropein aglycon, (VI) enol form of demethyloleuropein aglycon, (VII) demethyloleuropein aglycon dialdehyde, (VIII) 4-noroleuropein aglycon (3,4-dihydroxyphenyl ethyl alcohol decarboxymethyl elenolic acid dialdehyde or 3,4-DHPEA-EDA), (IX) 3,4-DHPEA-EDA acetal, (X) oleoside methyl ester, (XI) elenolic acid, (XII) oleuropein dialdehyde (keto form), (XIII) Cannizzaro-like product of oleuropein dialdehyde, (XIV) lactone of XII, (XV) oleuropein dialdehyde (monohydrate), (XVI) elenolic acid dialdehyde, (XVII) oleoside, (XVIII) acetal of XIX, (XIX) decarboxymethyl elenolic acid dialdehyde DEDA, (XX) demethyloleuropein aglycon acetal, (XXI) Cannizzaro-like product of XIX, (XXII) lactone form of XXI, (XXIII) demethylolenic acid, (XXIV) elenolic acid mono-aldehyde (rearrangement product), (XXV) hydroxytyrosol elenolate (oleuropein aglycon aldehyde form or 3,4-DHPEA-EA). Reproduced from ref. 37.

processos de maturação da azeitona e posterior processamento na produção de azeite virgem. R representa o hidroxitirosol.



### 1.3 Efeitos biológicos dos compostos fenólicos da azeitona e suas implicações para a saúde humana

A descoberta do efeito da dieta mediterrânica na prevenção de doenças cardiovasculares e cancro tem já muitas dezenas de anos. Resultou da constatação da menor incidência deste tipo de doenças nas populações do Mediterrâneo Norte (Grécia, Espanha, Itália) do que nas do Norte da Europa e foi progressivamente ganhando aceitação generalizada, tanto na opinião pública como na classe médica. Embora na multidão de fatores que podem ser causa destas disparidades seja difícil distinguir importâncias relativas, o facto do azeite ser a gordura base da alimentação mediterrânica projetou este alimento para uma primeira linha de atenção. Na composição dos azeites, gordura baseada no ácido oleico, um ácido gordo monoinsaturado, constituindo a trioleína a parte mais importante da massa total. Este facto é claramente relevante, pelas suas implicações na saúde dos consumidores, mas a existência no azeite virgem de muitas substâncias minoritárias, que não são degradadas no processo de expressão a frio, focou nelas a atenção de muitos estudos, em especial nos álcoois fenólicos tirosol e hidroxitirosol e seus derivados, que, tal como referido acima, têm elevada capacidade antioxidante. Na realidade, um artigo de revisão de Covas et al. [14] já em 2006 sublinhava que há variadas fontes alimentares de ácido oleico e que a abundância deste ácido monoinsaturado no plasma sanguíneo de europeus do Norte e do Sul não revela diferenças significativas, pelo que os benefícios para a saúde do azeite terão que ser procurados nos outros constituintes. Este artigo descreve a evidência existente de que os álcoois fenólicos se podem ligar às partículas lipídicas de baixa densidade (LDL) e exercer *in vivo* um efeito antioxidante. Sendo as partículas de LDL transportadores de colesterol no sangue (conhecidas em linguagem corrente como “mau colesterol”) e a sua oxidação reconhecida como causa de aterosclerose, este efeito antioxidante pode evidentemente constituir um importante benefício de saúde. No mesmo ano, o grupo de Covas, associado a um conjunto de outros grupos sediados em várias cidades europeias, publicou os resultados dum extenso conjunto de ensaios clínicos [15] sobre o efeito dos polifenóis do azeite nas doenças cardiovasculares. Os resultados positivos destes ensaios, em conjunto com outros ensaios de mais pequena dimensão [16] qualificaram o hidroxitirosol e os seus derivados para que a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA – European Food Safety Authority) incluísse nas 222 aprovações (em mais de 1800 processos submetidos), publicadas em Abril de 2011 [17], as alegações transcritas abaixo:

- i) *“Antioxidant properties - Polyphenols from olive have an antioxidant activity that may help maintain healthy LDL cholesterol level and lipid oxidation / antioxidants”*
- ii) *Lipid metabolism - Contributes to good HDL cholesterol level.*
- iii) *“Lipid metabolism - Polyphenols from olive have an antioxidant activity that may help protect LDL cholesterol and lipid oxidation.”*

Na realidade, a Food and Drug Administration Americana já em 2004 [18] tinha permitido a utilização de alegações de benefícios de saúde do azeite referentes a doenças cardiovasculares,

mas na base de substituição de gorduras saturadas, muito abundantes na dieta americana, por azeite e portanto por gorduras monoinsaturadas, mas sem relação com a composição fenólica dos azeites virgens.

Aquela autorização da EFSA veio reforçar o interesse no azeite e, especificamente, no hidroxitirosol e seus derivados, constituindo uma justificação parcial do grande aumento de publicações científicas nos últimos anos sobre este tema.

Três artigos de revisão sobre efeitos do hidroxitirosol na saúde humana foram recentemente publicados. Enquanto o artigo de Bulotta et al. [19] revê trabalhos sobre a proteção de doenças cardiovasculares, os outros dois referem-se a aplicações de saúde muito diversificadas e sobre as quais, não havendo ainda evidência empírica do tipo obtida para as aterosclerose com os ensaios clínicos acima descritos, há já muitas indicações positivas. Enquanto Bernini et al. [20] revêem as aplicações estudadas sobre prevenção do cancro, Hu et al. [21] dão uma panorâmica de novas aplicações, incluindo efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores.

#### **1.4 Métodos de separação e concentração de hidroxitirosol e derivados**

O interesse crescente no hidroxitirosol suscitou o desenvolvimento de métodos de separação, concentração e purificação desta substância e seus derivados a partir de vários materiais derivados da oliveira, sobretudo daqueles que apresentam menor valor económico, como os bagaços de azeitona, resíduos do processo de produção de azeite, e as folhas de oliveira [22].

*Araújo et al.* [9] reviram as técnicas desenvolvidas com os resíduos de lagares (“olive mill wastes”). A composição destes resíduos depende do tipo de processo utilizado na extração do azeite e do número de fases que utiliza (duas ou três fases). Em qualquer dos casos, a maior parte dos compostos fenólicos da azeitona é retida nestes resíduos, quer através de ligações, glucosídicas ou outras, às paredes celulares ou outros materiais sólidos, ou por partilha para a fase aquosa, quando esta é separada do azeite, sobretudo no caso dos compostos mais polares, como os álcoois fenólicos livres. Como estes resíduos são correntemente armazenados em grandes depósitos ao ar livre, até estarem suficientemente secos para se efetuar a extração por solventes do azeite remanescente, passam por uma série de transformações químicas, hidrólises e oxidações, frequentemente catalisadas por enzimas. *Fekia et al.* [23] estudaram a evolução ao longo do tempo de armazenagem da concentração em hidroxitirosol, tendo verificado que esta aumenta rapidamente nos primeiros 90 dias de armazenagem, enquanto a concentração de oleuropeína e outros ésteres do hidroxitirosol decresce concomitantemente. Esta evolução é indicativa duma hidrólise contínua, provavelmente por catálise enzimática, daqueles ésteres. Outra constatação curiosa é a de que o conteúdo em tirosol também aumenta, mas de forma muito menos acentuada do que a de hidroxitirosol, o que sugere uma maior resistência à hidrólise do ligustrosídeo e outros ésteres de tirosol.

Este enriquecimento em hidroxitirosol transforma os bagaços de azeitona numa fonte procurada deste composto. Dos métodos de separação propostos podemos listar a nanofiltração de extratos

aquosos [24], a extração com solventes, nomeadamente acetato de etilo [25], ou água+ etanol [26,27].

## **1.5 Formulação de azeites aditivados ricos em hidroxitirosol**

A regulamentação da EFSA sobre os efeitos do hidroxitirosol na prevenção de doenças cardiovasculares permite a explicitação de alegações de grande impacto no “marketing” e comercialização de azeites com alto teor em álcoois fenólicos e seus derivados. No entanto, raramente os azeites comerciais atingem a dose mínima exigida pela EFSA – 5mg de hidroxitirosol, tirosol e seus derivados em 20 g de azeite. A aditivação dos azeites comerciais surge assim como uma estratégia apetecível.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento do produto azeite aditivado, com base na adição a azeite de um concentrado aquoso de hidroxitirosol obtido pelos métodos descritos na patente correspondente à referência [24].

## Bibliografia

- [1] H.Chimi, A. Sadik, B. Le Tutour, and M. Rahamani, Contribution à l'étude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol, de l'hydrosytyrosol, de l'acide caffeique, de l'oleuropeine et du B.H.T., *Rev. Franç. Corps Gras*, 1988, 35, 339-344
- [2] G. Papadopoulos, D. Boakou, Antioxidant Effect of Natural Phenols on Olive Oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1991, 68, 669-671
- [3] M. Baldioli, M. Servili, G. Perretti, G.F. Montedoro. Antioxidant Activity of Tocopherols and Phenolic Compounds of Virgin Olive Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996,73, 1589-1594
- [4] F. Visioli, G. Bellomo, G.F. Montedoro, C. Galli. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 117 (1995) 25-32
- [5] F. Visioli, G. Bellomo, C. Galli. Free Radical-Scavenging Properties of Olive Oil Polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 247, 60–64
- [6] H. K. Obied, P. D. Prenzler, D. Ryan, M. Servili, A. Taticchi, S. Esposto, K. Robards. Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Nat. Prod. Rep.*, 2008, **25**, 1167-1179
- [7] K. Kotsiou , M. Tasioula-Margari. Monitoring the phenolic compounds of Greek extra-virgin olive oils during storage. *Food Chem.* 2016, 200, 255–262
- [8] S. Charoenprasert, A. Mitchell. Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*). *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 7081–7095
- [9] M. Araújo, F.B. Pimentel, R.C. Alves, M.B.P.P. Oliveira. Phenolic compounds from olive mill wastes: Health effects, analytical approach and application as food antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.* 2015, 45, 200-211
- [10] A.F. Vinha, F. Ferreres, B.M. Silva, P. Valentão, A. Gonçalves, J.A. Pereira, M.B. Oliveira, R. M. Seabra, P.B. Andrade. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry* 2005, 89, 561–568.
- [11] M. N. Franco, T. Galeano-Díaz, O. López, J.G. Fernández-Bolaños, J. Sánchez, C. de Miguel, M. V. Gil, D. Martín-Vertedor. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food Chem.* 2014, 163, 289–298.

- [12] P. Reboredo-Rodríguez, C. González-Barreiro, B. Cancho-Grande, G. Fregapane, M.D. Salvador, J. Simal-Gándara. Characterisation of extra virgin olive oils from Galician autochthonous varieties and their co-crushings with Arbequina and Picual cv. *Food Chem.* 2015, 176, 493–503
- [13] V. Sánchez de Medina, F. Priego-Capote, M.D. Luque de Castro. Characterization of monovarietal virgin olive oils by phenols profiling. *Talanta* 2015, 132, 424–432
- [14] M.-I. Covas, V. Ruiz-Gutiérrez, R. de la Torre, A. Kafatos, R.M. Lamuela-Raventós, J. Osada, R.W. Owen, F. Visioli. Minor Components of Olive Oil: Evidence to Date of Health Benefits in Humans. *Nutrition Rev.* 2006, Vol. 64, S20-S30
- [15] M.-I. Covas, K. Nyyssönen, H.E. Poulsen, J. Kaikkonen, H.-J.F. Zunft, H. Kiesewetter, A. Gaddi, R. de la Torre, J. Mursu; H. Bäumler, S. Nascetti, J.T. Salonen, M. Fitó, J. Virtanen, J. Marrugat. The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors. A Randomized Trial. *Ann Intern Med.* 2006, 145, 333-341.
- [16] T. Weinbrenner, M. Fitó, R. de la Torre, G.T. Saez, P. Rijken, C. Tormos, S. Coolen, M.F. Albaladejo, S. Abanades, H. Schroder, J. Marrugat, M.-I. Covas. Olive Oils High in Phenolic Compounds Modulate Oxidative/Antioxidative Status in Men. *J. Nutrition* 2004, 2314-2321
- [17] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No. 1924/2006. *EFSA J.* 2011, 9 (4), 1–25.
- [18] <http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/labelingnutrition/ucm072963.html>
- [19] S. Bulotta, M. Celano, S.M. Lepore, T. Montalcini, A. Pujia, D. Russo. Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *J. Translat. Med.* 2014, 12, 219-228
- [20] R. Bernini, M.S.G. Montani, N. Merendino, A. Romani, F. Velotti. Hydroxytyrosol-Derived Compounds: A Basis for the Creation of New Pharmacological Agents for Cancer Prevention and Therapy. *J. Med. Chem.* 2015, 58, 9089–9107
- [21] T. Hu, X.-W. He, J.-G. Jiang, X.-L. Xu. Hydroxytyrosol and Its Potential Therapeutic Effects. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 1449–1455
- [22] A. Guinda. Use of solid residue from the olive industry. *Grasas y Aceites* 2006, 57, 107-115



- [23] M. Fekia, N. Allouche, M. Bouaziz, A. Gargoubi, S. Sayadi. Effect of storage of olive mill wastewaters on hydroxytyrosol concentration. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2006, 108, 1021–1027
- [24] M. Nunes da Ponte, J.L. C. Santos, A. Matias, A.V.M.Nunes, C.M.M. Duarte, J.G.Crespo. Method of obtaining a hydroxytyrosol-rich from olive tree residues and sub-products using clean technologies. US Patent: 8,066,998B2.
- [25] N. Allouche, I.Fki, S.Sayadi. Toward a High Yield Recovery of Antioxidants and Purified Hydroxytyrosol from Olive Mill Wastewaters. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 267-273
- [26] J. Lozano-Sánchez, M. Castro-Puyana, J.A. Mendiola, A. Segura-Carretero, A. Cifuentes, E. Ibáñez. Recovering Bioactive Compounds from Olive Oil Filter Cake by Advanced Extraction Techniques. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 16270-16283
- [27] M. Suárez, M.-P. Romero, T. Ramo, A. Maciá, M.-J. Motilva. Methods for Preparing Phenolic Extracts from Olive Cake for Potential Application as Food Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 1463–1472



## **2 Materiais e métodos**

### **2.1 Materiais**

#### **2.1.1 Bagaços de azeitona**

Os bagaços utilizados neste trabalho resultaram de duas origens diferentes. A primeira foi a UCASUL, localizada no Alentejo (Alvito, Portugal) que é uma empresa que se destina à produção de óleo de bagaço. A UCASUL percorre todos os lagares da região e recolhe os bagaços, já que se trata de um resíduo não aproveitado na produção de azeite e armazena-o em grandes piscinas ao ar livre. A segunda é a empresa AZAL, sediada no Alentejo (Redondo, Portugal) que se destina à produção de azeite, sendo que os bagaços fornecidos resultaram dessa produção.

Os bagaços estudados referem-se a três campanhas diferentes: 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016.

O bagaço cujo teor em HT é utilizado como referência ao longo deste trabalho (por se ter mantido estável desde a sua recolha em 2014), foi um lote de bagaço fornecido pela empresa UCASUL, denominado UCASUL Campanha 2013/2014. Pela empresa AZAL, foram fornecidas amostras de um bagaço da campanha 2014/2015 que esteve armazenado em diferentes condições: (i) um esteve armazenado num reboque ao ar livre, foi denominado de AZAL Campanha 2014/2015 Reboque, (ii) o outro esteve armazenado num tegão, também ao ar livre e foi denominado de AZAL Campanha 2014/2015 Tegão. Amostras destes dois bagaços foram sendo fornecidas ao longo do tempo.

Já na fase final desta dissertação, foi fornecida uma nova amostra de bagaço pertencente à campanha 2015/2016, que foi denominada de AZAL Campanha 2015/2016.

#### **2.1.2 Concentrados de osmose inversa (RO)**

Os extratos naturais estudados neste trabalho, foram produzidos através de um processo patenteado (WO2007013032A22007), que consiste numa extração com água do bagaço de azeitona, seguida de um passo de nanofiltração e por fim um passo de concentração por osmose inversa. O produto final deste processo foi fornecido pela AZAL e é denominado ao longo de todo o trabalho por concentrado de osmose inversa, com código RO, especificamente RO5, RO6, RO7 e RO8.

### 2.1.3 Azeites

Foram estudados vários azeites no âmbito deste trabalho, nomeadamente o Azeite Oliveira da Serra Virgem Extra e o Azeite Dia Virgem Extra Seleção que foram adquiridos em supermercados locais (Lisboa, Portugal). Foram também utilizados o Azeite BIO não filtrado, Azeite Arbequina e Azeite Galega, fornecidos pela empresa AZAL (Redondo, Évora).

### 2.1.4 Solventes, reagentes e padrões

A tabela 2.1. apresenta todos os solvente, reagentes e padrões utilizados neste trabalho, bem como o respetivo CAS, pureza e marca.

**Tabela 2.1-** Todos os solventes, reagentes e padrões utilizados neste trabalho.

<b>Material</b>	<b>CAS</b>	<b>Pureza(%)</b>	<b>Marca</b>
<b>Acetona</b>	67-64-1	≥ 99,8	Sigma Aldrich
<b>Ácido Acético glacial</b>	200-580-7	100	Merck
<b>Ácido Cítrico</b>	77-92-9	-	Labor Spirit
<b>Ácido Sulfúrico</b>	7664-93-9	95-97	Fluka
<b>Árgon</b>	7440-37-1	-	Air Liquide
<b>Carvão BDH</b>	-	-	Norit
<b>Carvão Norit GAC 1240</b>	7440-44-0	-	Norit
<b>Carvão GAC 1240 com tratamento de HNO<sub>3</sub></b>	-	-	Norit
<b>Etanol</b>	64-17-5	96	Carlo Erba
<b>Gliceril Monooleato (GMO)</b>	67701-06-08	-	LONZA INC.
<b>Glicerol</b>	56-81-5	≥ 99,0	Sigma Aldrich
<b>Hidróxido de sódio</b>	1310-73-2	-	Labor Spirit
<b>Hidroxitirosol</b>	10597-60-1	≥ 98	ExtraSynthese
<b>Metanol</b>	67-56-1	≥ 99,9	Carlo Erba
<b>Molecular Sieve</b>	308080-99-1	-	Fluka
<b>Resina XAD4</b>	9003-69-4	-	Sigma Aldrich
<b>Span 20</b>	1338-39-2	-	Fluka
<b>Tirosol</b>	501-94-0	98	Sigma Aldrich
<b>Tween 85</b>	9005-70-3		Croda

## **2.2 Métodos**

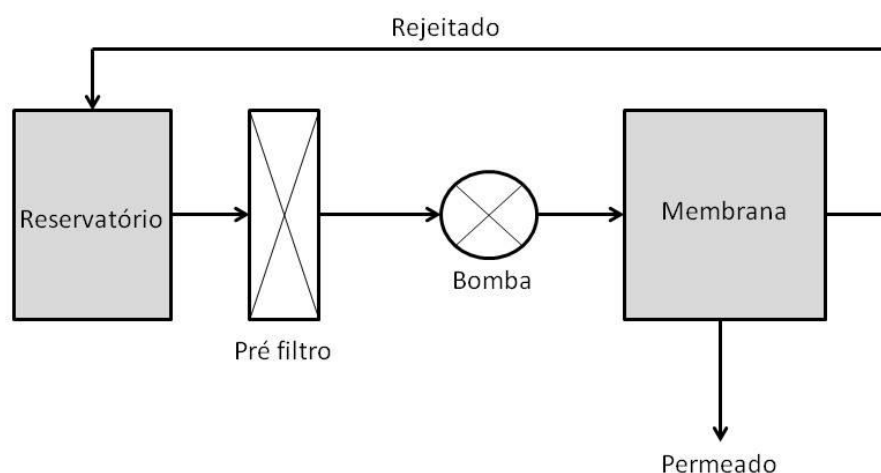
### **2.2.1 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em bagaços de azeitona**

A quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) livres apenas contabiliza as moléculas de HT e Ty que não se encontram ligadas a outras moléculas.

Para extrair o HT e Ty pesaram-se 20 g de cada bagaço. De seguida adicionaram-se 13 ml de água destilada a cada bagaço e agitou-se, à temperatura ambiente e a 300-400 rpm, durante 1 hora. Após a agitação centrifugaram-se as amostras durante 15 min, à temperatura ambiente e a 2000-3000 rpm. Após a centrifugação, separou-se a fase aquosa com o auxílio de uma seringa para um vial de 10 ml. No final, enviaram-se as amostras para análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise de HPLC foi utilizada para caracterizar o perfil fenólico (hidroxitirosol e tirosol) de extratos de bagaço usando dois aparelhos: Dionex ICS3000 com o *software* Chromeleon V.6.8 e Thermo Scientific Surveyor com o *software* Thermo Chromquest 5.0 V.3.2.1. A coluna usada foi uma coluna Waters Novapak C18 (150 x 3,9 mm). A temperatura da coluna foi mantida a 25°C. A fase móvel consistiu de um sistema binário usando 10% metanol e 2% ácido acético em água ultra pura Tipo I. O volume de injeção foi 25 µl. A deteção e quantificação foram realizadas a 210 nm (no primeiro aparelho) e 280 nm (no segundo aparelho). A curva de calibração foi injetada no início da corrida.

### **2.2.2 Nanofiltração de extrato de bagaço de azeitona- ensaios de laboratório**

Com o objetivo de aumentar a produtividade do processo de nanofiltração, efetuou-se um ensaio laboratorial utilizando uma membrana (NF270) com uma massa molar de corte superior à utilizada nas instalações da AZAL à escala piloto (membrana DK). O ensaio envolveu a extração preliminar de 30 kg de bagaço de azeitona UCASUL Campanha 2013/2014 num reator *Batch* com agitador, numa instalação piloto. Adicionaram-se 20 litros de água e colocou-se o reator a agitar durante 1 h à temperatura ambiente. De seguida, com o auxílio de uma meia de vidro, separou-se a fase aquosa (4 L) para um recipiente. A fase aquosa foi depois centrifugada com o fim de separar partículas sólidas para dar início à nanofiltração. A instalação de nanofiltração foi montada de acordo com a figura 2.1:



**Figura 2.1-** Esquema de montagem da instalação utilizada para nanofiltração da fase aquosa do bagaço UCASUL Campanha 2013/2014.

Para efeitos de comparação, realizaram-se dois ensaios com dois tipos de membranas diferentes. Em cada um foi processado 1 litro de extrato de bagaço de azeitona. O pré-filtro utilizado foi de dimensão 70  $\mu\text{m}$ . As membranas utilizadas foram a NF270 (DOW) e a DK (GE). A pressão de operação foi 10 bar. Registou-se a quantidade de permeado a cada 10 min.

Na tabela 2.2 estão descritas as características das duas membranas utilizadas neste trabalho.

**Tabela 2.2-** Especificações técnica das membranas NF270 e DK.

<b>Características das membranas NF270 e DK</b>		
<b>Parâmetro</b>	<b>Membrana NF270</b>	<b>Membrana DK</b>
<b>MWCO*(Da)</b>	200-400	150-300
<b>Temperatura máxima de operação (°C)</b>	45	50
<b>Pressão máxima de operação (Psi)</b>	600	600 se $T < 35^{\circ}\text{C}$ 435 se $T > 35^{\circ}\text{C}$
<b>Gama de pH</b>	2-11	3-9

\*Massa molar de corte

A determinação da permeabilidade hidráulica é feita segundo a equação de Darcy:

$$J_V = L_p \Delta P_{TM}$$

**Equação 2.1-** Equação de Darcy

Onde  $J_v$  é o fluxo,  $L_p$  a permeabilidade hidráulica, e  $\Delta P_{TM}$  a pressão transmembranar.

O fator de concentração é determinado pela equação 2.2.

$$F = \frac{C_o}{C_c}$$

**Equação 2.2-** Equação do fator de concentração

Onde F é o fator de concentração,  $C_o$  a concentração inicial e  $C_c$  a concentração de permeado num momento t

Mais detalhadamente, a figura 2.2 apresenta o esquema de montagem específico para este ensaio.



**Figura 2.2-** Montagem de nanofiltração da fase aquosa do bagaço UCASUL Campanha 2013/2014.

O produto deste processo, o permeado da nanofiltração é denominado ao longo deste trabalho por nanofiltrado, com código NF. No final do ensaio recolheram-se amostras da alimentação e do nanofiltrado que foram enviadas para análise por HPLC. A análise de HPLC foi utilizada para caracterizar o perfil fenólico (hidroxitirosol e tirosol) como descrito na secção 2.2.1.

### **2.2.3 Osmose inversa de nanofiltrado da membrana NF270- ensaio de laboratório**

Após o processo de nanofiltração com a membrana NF270, procedeu-se à concentração do nanofiltrado (NF) através de um processo de osmose inversa, o que deu origem a um concentrado de osmose inversa (denominado por RO). Este ensaio foi feito na FCT/UNL, mas fora do âmbito deste trabalho. Foi fornecida uma amostra de RO para quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) livres por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise de HPLC foi utilizada para caracterizar o perfil fenólico (HT e Ty) como descrito na secção 2.2.1.

Esta operação é feita a nível industrial, mas o procedimento foi feito a nível laboratorial.

### **2.2.4 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em concentrados de osmose inversa fornecidos pela AZAL**

Para a quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (T) livres dos concentrados de osmose inversa fornecidos pela AZAL (RO5, RO6, RO7 e RO8), verteu-se um pouco (~10 ml ) de cada lote para um *vial*. De seguida enviou-se para análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise de HPLC foi utilizada para caracterizar o perfil fenólico (HT e Ty) como descrito na secção 2.2.1.

### **2.2.5 Evolução no tempo dos concentrados de osmose inversa**

Foram realizados três ensaios para avaliar a evolução no tempo nos concentrados de osmose inversa (RO).

Começou por se estudar o potencial do ácido cítrico para atuar como conservante do concentrado. Prepararam-se cinco soluções de RO5 (ver secção 2.1.2) em balões volumétricos de 100 mL. A primeira foi preparada com 100 mL de RO5. A segunda foi colocada num gobelé. As restantes foram preparadas adicionando 3 g de ácido cítrico por litro de RO5. De seguida fecharam-se os balões e colocaram-se em condições de armazenamento diferentes. Das soluções que não continham ácido cítrico, uma foi armazenada à luz e à temperatura ambiente, sendo que a solução que estava no gobelé foi armazenada no escuro (envolvida em papel de alumínio). Das soluções que continham ácido cítrico, uma foi deixada à luz e à temperatura ambiente, outra foi armazenada no escuro (envolvida em papel de alumínio) à temperatura ambiente e, finalmente, a outra no frigorífico.

Efetuiu-se o mesmo procedimento para o concentrado de osmose inversa RO7 (ver secção 2.1.2).

Tiraram-se fotografias ao longo do tempo para acompanhar a evolução da cor.



No segundo ensaio, estudou-se o concentrado de osmose inversa RO8 (ver secção 2.1.2). Colocou-se um pouco de RO8 em três *vials* devidamente fechados. Um vial foi deixado à luz e à temperatura ambiente. Outro foi armazenado também à temperatura ambiente, mas colocado no escuro (envolvido em papel de alumínio). E, finalmente, o terceiro vial foi armazenado no frigorífico.

Tiraram-se fotografias para fazer o acompanhamento da cor ao longo do tempo.

Finalmente, no terceiro ensaio procedeu-se à medição de pH do RO8 com auxílio de um medidor de pH e registou-se o seu valor.

## **2.2.6 Evaporação de concentrados de osmose inversa e propriedades de concentrados de osmose inversa evaporados**

### **2.2.6.1 Evaporação de concentrados de osmose inversa**

Os concentrados de osmose inversa (RO) foram evaporados com o auxílio de um evaporador rotativo, a vácuo, com condensador horizontal (Heidolph).

Em relação ao concentrado de osmose inversa RO5 (ver secção 2.1.2), realizaram-se várias réplicas em que se concentrou a solução cinco vezes, com auxílio do evaporador rotativo a 35°C, com rotação entre 210-240 rpm. A evaporação foi feita com o fim de concentrar a solução e assim aumentar a sua concentração em HT. O produto final deste processo foi designado por concentrado de osmose inversa evaporado (C). Efetuou-se o mesmo procedimento para o RO6, designado por C61 (C-concentrado; concentrado de osmose inversa-RO6, réplica- 1) e para o RO7, designando por C71 (C-concentrado; concentrado de osmose inversa-RO7; réplica-1)

Finalmente, em relação ao concentrado de osmose inversa RO8, prepararam-se várias amostras por evaporação, do mesmo modo que as anteriores. Neste caso efetuou-se um estudo em que se utilizou o banho do evaporador a diferentes temperaturas (35°C, 60°C, 80°C e 90°C). Uma vez que o RO8 era um concentrado menos rico em HT, concentrou-se a solução dez vezes, vinte vezes, tendo também sido levado à secura numa tentativa de eliminação dos compostos voláteis. Quando levado à secura, o RO8 adquiriu um aspeto de mel, tendo sido depois redissolvido com água até perfazer um volume de 10% da solução inicial (o equivalente a uma concentração de dez vezes). A algumas réplicas não se aplicou este passo e a redissolução com água foi substituída por glicerol. Foram feitas várias réplicas das amostras mencionadas acima.

### **2.2.6.2 Titulação de concentrados de osmose inversa evaporados**

Para a titulação, inicialmente preparou-se uma solução 0,1 M de hidróxido de sódio (NaOH).

Verteram-se 10 mL de RO8 evaporado para um balão. De seguida encheu-se uma bureta com a solução de NaOH. Registou-se o volume inicial da bureta. Abriu-se a torneira de modo à solução

cair gota a gota. À medida que se ia adicionando a solução básica foi-se medindo o pH. Para outras amostras de RO8 evaporados fez-se apenas a leitura direta do pH.

### **2.2.6.3 Ensaio para estudo da coloração e odor de concentrados de osmose inversa evaporados**

Outro ensaio realizado serviu para estudar a coloração e o odor em RO8 evaporados. O concentrado de osmose inversa evaporado RO8 (50 mL) foi dividido igualmente por sete *vials* devidamente fechados. O *vial* A foi colocado à luz e à temperatura ambiente. O *vial* B foi injetado com árgon e colocado nas mesmas condições do *vial* A. O *vial* C foi aditivado com 3 g/L de ácido cítrico (de acordo com a Diretiva 95/2/CEE [2]) e colocado nas mesmas condições que os dois *vials* anteriores. O *vial* D foi injetado com árgon e colocado no frigorífico. O *vial* E foi injetado com árgon e colocado no escuro. O *vial* F foi adicionado com 3 g/L de ácido cítrico, injetado com árgon e colocado à luz e à temperatura ambiente. E, finalmente, o *vial* G foi adicionado com 3 g/L de ácido cítrico e colocado no escuro. Tiraram-se fotografias para acompanhar a evolução da cor dos RO8 evaporados.

Duas amostras de RO8 evaporado, ambas com aspeto tipo mel, foram deixadas durante a noite em banhos. Uma num banho maria a 80°C e outra num banho a vácuo, também a 80°C. No dia seguinte foram redissolvidas com água até perfazer um volume de 10% da solução inicial. Nesse mesmo dia o seu odor foi comparado com o do seu correspondente (sem *overnight*).

O concentrado de osmose inversa, concentrado vinte vezes, foi deixado num banho a vácuo a 100°C durante a noite. No dia seguinte foi redissolvido até perfazer 10% da solução inicial. Nesse mesmo dia o seu odor foi comparado com o os seu correspondente (sem *overnight*).

O concentrado de osmose inversa concentrado dez vezes, a 35°C foi deixado num banho a vácuo a 35°C durante a noite. No dia seguinte o seu odor foi comparado com o do seu correspondente (sem *overnight*). Registaram-se todas as observações e tirou-se uma foto no final do ensaio.

## **2.2.7 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em concentrados de osmose inversa evaporados**

Para a quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) livres de alguns concentrados de osmose inversa evaporados verteu-se um pouco (~10 mL) de cada lote para um *vial*. De seguida enviou-se para análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise de HPLC foi utilizada para caracterizar o perfil fenólico (HT e Ty) como descrito na secção 2.2.1.

## **2.2.8 Pervaporação de concentrados de osmose inversa evaporados**

Este ensaio foi realizado pelo grupo de tecnologia de membranas da FCT-UNL, mas os resultados analisados no âmbito deste trabalho. Apenas foram fornecidas as amostras finais (dois pervaporados e dois retentados (o que a membrana rejeitou). Foram realizados dois ensaios. Ambos os ensaios tiveram a duração de ~5 h. No primeiro ensaio produziram-se duas amostras que foram designadas por retentado 1 (Ret1) e o pervaporado respetivo (Perv1). No segundo ensaio foram também produzidas duas amostras designadas por retentado 2 (Ret2) e o pervaporado respetivo (Perv2).

As amostras Ret1 e Ret2 foram quantificadas em termos de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) livres por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise de HPLC foi utilizada para caracterizar o perfil fenólico (HT e Ty) como descrito na secção 2.2.1.

### **2.2.9 Adsorção de concentrados de osmose inversa e concentrados de osmose inversa evaporados em carvões ativados**

Procedeu-se à adsorção em três carvões ativados diferentes (GAC, BDH e  $\text{HNO}_3$ ) do concentrado de osmose inversa RO8 (ver secção 2.1.2), em sistema *Batch*. Para cada ensaio fizeram-se duas passagens utilizando uma razão mássica sólido/líquido de 1:10.

No final enviaram-se as amostras para quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) livres por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise de HPLC foi utilizada para caracterizar o perfil fenólico (HT e Ty) como descrito na secção 2.2.1.

Foi realizado o mesmo procedimento para o concentrado de osmose inversa evaporado (RO8 concentrado dez vezes, a 35°C num evaporador rotativo).

### **2.2.10 Adsorção com resina XAD4 em concentrados de osmose inversa e concentrados de osmose inversa evaporados**

Estas experiências foram realizadas com base no artigo de Zagkalis et al.[3]. Inicialmente fez-se a preparação da resina. Juntou-se acetona à resina na razão mássica de (4:1), fechou-se o frasco com Parafilm M® e colocou-se num *shaker* orbital durante a noite. No final filtrou-se a resina a vácuo e lavou-se a resina em primeiro lugar com etanol e depois com água.

De seguida deu-se início ao processo de adsorção. Utilizaram-se 35 mL de concentrado de osmose inversa RO8 (ver secção 2.1.2) e 120 g de resina por litro, e deixou-se agitar à temperatura ambiente durante 3 h, a 500 rpm. Procedeu-se à filtração a vácuo da resina e recolheu-se o “não adsorvido” para um novo frasco.

Iniciou-se depois o passo de dessorção utilizando 35 mL de água, para remover os hidratos de carbono da resina. Deixou-se agitar durante 3 horas, nas mesmas condições descritas acima. Filtrou-se novamente a resina a vácuo e reservou-se o “dessorvido com água”.

Efetuiu-se um novo passo de dessorção com 35 mL de etanol para remover os fenóis. Agitou-se durante 3 horas nas mesmas condições referidas acima. Filtrou-se então a resina e recolheu-se o “dessorvido com etanol” para um novo frasco. Esta última amostra foi evaporada com auxílio de um evaporador rotativo (*Heidolph*) até evaporação total do etanol. No final redissolveu-se em 10 mL de água.

No final as amostras denominadas por “não adsorvido”, “dessorvido com água” e “dessorvido com etanol” foram quantificadas em termos de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) livres por HPLC.

Também se procedeu a uma adsorção realizada como descrito anteriormente, mas na qual o processo de dessorção com água foi eliminado, passando-se diretamente à dessorção com etanol. No final enviaram-se as amostras para quantificação de HT e Ty livre por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise de HPLC foi utilizada para caracterizar o perfil fenólico (HT e Ty) como descrito na secção 2.2.1.

Foi realizado o mesmo procedimento para o concentrado de osmose inversa evaporado (RO8 concentrado dez vezes, a 35°C num evaporador rotativo).

- Otimização da adsorção em resina XAD4 do RO8

Foram preparados quatro ensaios para otimização da passo de adsorção, em que se variou a temperatura (20°C versus 0°C), o tempo (3 horas versus 5 horas) e a quantidade de resina (120 g/L versus 240 g/L). Para cada um dos ensaios recolheu-se o “não adsorvido” para um novo frasco e enviou-se para análise de HPLC.

### **2.2.11 Incorporação de concentrados de osmose inversa evaporados em azeites comerciais**

Inicialmente foram preparados azeites aditivados com 1% (m/m) de concentrado de osmose inversa evaporado. A incorporação foi feita utilizando um homogeneizador *Turrax* (IKA) que permite atingir velocidades de 6500-24000 rpm. Introduziu-se este aparelho no azeite base (ver secção 2.1.3) e foi-se deitando gota a gota o concentrado de osmose inversa evaporado. Agitou-se durante 10 min. No final verteu-se para garrafas de vidro escuro devidamente fechadas e fez-se borbulhar árgon em alguns azeites, a fim de evitar a oxidação. O armazenamento foi feito à temperatura ambiente. Um dos azeites foi dividido igualmente por quatro garrafas de vidro transparentes. Uma foi colocada à luz e ao ar. Outra foi injetada com árgon e ,devidamente fechada, colocada à luz. A terceira foi injetada com árgon, devidamente fechada, e foi colocada no escuro. E por último a quarta garrafa foi injetada com árgon, devidamente fechada, e colocada no frigorífico.

Passado um mês tirou-se uma fotografia para observar as alterações e registar o azeite que menos alterou de cor.

Também foram feitas incorporações variando a quantidade de concentrado de osmose inversa evaporado adicionada, variando o tempo de funcionamento do *Turrax* (1 min, 10 min e 20 min), as rotações (6500-24000 rpm) e até mesmo substituindo este instrumento por uma varinha mágica tradicional (Bosch). Houve também azeites preparados com retentados, Ret1 e Ret2 (ver secção 2.2.8). Além disso, foi preparado um azeite aditivado com concentrado de osmose inversa, dessorvido com etanol em resina XAD4 otimizada (“RO8 dessorvido com etanol”, ver secção 2.2.10).

Um azeite incorporado foi dividido em duas garrafas e numa colocou-se um pouco de *molecular sieve*. Registaram-se resultados.

Finalmente, foram preparados azeites aditivados em que a incorporação também incluiu a adição de emulsionantes (Span 20, Tween 85 e GMO) segundo Polychniatou et al. [4] em diversas razões de emulsionante: concentrado de osmose inversa. Para o Span 20 e GMO utilizaram-se as razões 2:1, 4:1 e 2:2. E ainda fez-se uma incorporação num azeite com uma mistura de emulsionantes na razão de Span 20: Tween 85- 70:30.

#### **2.2.12 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em azeites base e azeites aditivados**

Procedeu-se à pré-agitação dos azeites base (ver secção 2.1.3.) e de azeites aditivados (ver secção 2.2.11) antes da recolha da amostra, a fim de homogeneizar o azeite. De seguida pesaram-se 5 g desse azeite, num copo, e adicionaram-se 10 mL de metanol. A solução foi agitada, com o auxílio de uma placa de agitação, a 700 rpm, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Procedeu-se à centrifugação a 2x1000 rpm, à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Extraíu-se a fase aquosa com o auxílio de uma seringa e reservou-se num balão esmerilado de fundo redondo de 100 mL. A fase orgânica foi vertida de novo para o copo inicial e adicionaram-se mais 10 mL de metanol. A solução foi de novo agitada nas mesmas condições referidas acima e novamente centrifugada, também nas mesmas condições já mencionadas. Extraíu-se de novo a fase aquosa para o mesmo balão. De seguida, a fase aquosa que estava no balão foi colocada no evaporador rotativo (Heidolph) a 35°C, à rotação entre 150-210 rpm, até à evaporação total do metanol.

Após a evaporação, a fase aquosa seca foi redissolvida em 2 mL de uma solução 60% metanol 40% água destilada. Essa solução foi vertida para um *vial* e de seguida enviada para análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise de HPLC foi utilizada para caracterizar o perfil fenólico (HT e Ty) como descrito na secção 2.2.1.

### **2.2.13 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol totais em azeites base e azeites aditivados**

A quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) totais além de contabilizar as moléculas de HT e Ty livres contabiliza também estas moléculas quando estão ligadas a outras, formando os compostos derivados. Esta quantificação foi feita por HPLC-MS ou por hidrólise ácida dos compostos derivados e subsequente análise por HPLC-UV.

Foram preparadas duas réplicas do azeite base Azeite Oliveira da Serra Virgem Extra (AZOLS) e de um azeite aditivado segundo o método descrito na secção 2.2.11, mas com a ocultação do passo de redissolução final da solução metanol: água. No final as amostras foram enviadas para a Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FF/UL) para análise por HPLC-MS.

Outro ensaio para a quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) totais foi a hidrólise ácida em duas amostras previamente feitas segundo o método mencionado na secção 2.2.11, segundo Mastralexi et al. [5]. Inicialmente preparou-se uma solução de ácido sulfúrico 1 M. Para cada ensaio mediram-se 200 µL de fase aquosa de cada azeite aditivado e foram adicionados 200 µL de ácido sulfúrico 1 M, em triplicado. De seguida, esta solução foi colocada num banho maria a 80°C com controlador de temperatura, durante 2 horas com auxílio de uma placa de aquecimento sob agitação magnética. A cada amostra foram adicionados 200 µL de solvente de HPLC, mais concretamente, uma solução de 10% de metanol e 2% de ácido acético em água ultrapura Tipo I. No final juntaram-se os triplicados num *vial* que foi enviado para quantificação de HT e Ty totais por análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise de HPLC foi utilizada para caracterizar o perfil fenólico (HT e Ty) como descrito na secção 2.2.1.

### **2.2.14 Cromatografia gasosa por *headspace* acoplada a espectrometria de massa**

As análises foram realizadas num cromatógrafo gasoso Bruker Scion 456-GC acoplado com um espectrómetro de massa Triplo Quadrupolo (TQ). O injetor foi operado a 260°C no modo *Splitless* com razão 1:20 nos 3 min iniciais e o detetor de chama FID foi operado a 250°C. As três colunas utilizadas foram uma DB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm d.i.), uma DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm d.i) e a terceira coluna encontrava-se desativada. O gás de corrida utilizado foi o hélio Tipo II. A temperatura inicial do forno foi de 40°C, permanecendo nesta 5 min, seguida por uma rampa de aquecimento a uma taxa de 4°C/ min até 240°C, permanecendo 5 min. O tempo total de corrida foi 60 min.

Os dois controladores de fluxo funcionaram a pressão constante. O tipo Eletronic Flux Controller (EFC) 21- funcionou a 35 psi e o tipo EFC 24 funcionou a 23 psi.

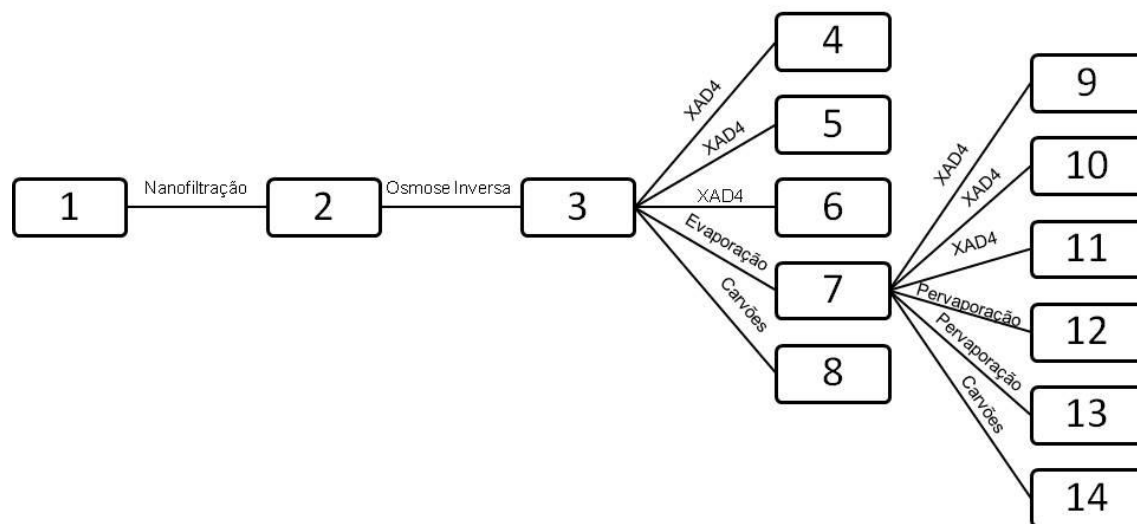
No espectrómetro de massa a temperatura da fonte foi 220°C e a temperatura da linha de transferência foi 240°C. Utilizou-se uma fibra tripla SPME. Os iões foram recolhidos e analisados na gama 40-450 m/z. A corrida de extração durou 1 h a 50°C.

O software utilizado foi MS Data Review.

A figura 2.3. apresenta um esquema para a obtenção dos principais produtos obtidos nesta tese.







**Figura 2.3-** Esquema para a obtenção dos principais produtos obtidos nesta tese.

Legenda:

1 Extrato de bagaço de  
azeitona  
2. Nanofiltrado  
3 Concentrado de osmose  
inversa  
4 Não adsorvido  
5 Dessorvido com água  
6 Dessorvido com etanol

7 Evaporado  
8 Não adsorvido por carvões  
9 Não adsorvido  
10 Dessorvido com água  
11 Dessorvido com etanol  
12 Retentado 1  
13 Retentado 2  
14 Não adsorvido por carvões

## Bibliografia

- [1] M. Nunes da Ponte, J.L. C. Santos, A. Matias, A.V.M.Nunes, C.M.M. Duarte, J.G.Crespo. Method of obtaining a hydroxytyrosol-rich from olive tree residues and sub-products using clean technologies. US Patent: 8,066,998B2.
- [2] Parlamento Europeu e do Conselho. Diretiva 95/2/CE de 20 de Fevereiro de 1995. 1995 (pp. 1-53)
- [3] A. Mastralexi, N.Nenandis, M.Tsimidou, Addressing Analytical Requirements to Support Health Claims on "Olive Oil Polyphenols" (EC Regulation 432/2012). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, 62, 2459-2461.
- [4] V. Polychniatou, C. Tzia. Study of Formulation and Stability of Co-surfactant Free Water-in-Olive Oil Nano- and Submicron Emulsions with Food Grade Non-ionic Surfactants. *Journal Am Oil Chem Soc*. 2014, 91, 79-88.
- [5] D. Zaglikis, A. Vavouraki, M. Kornaros, C. Paraskeva. Purification of olive mill wastewater phenols through membrane filtration and resin adsorption/desorption. *Journal of Hazardous Materials*. 2015, 285, 69-76.

### 3 Apresentação de resultados

#### 3.1 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres por HPLC em bagaços de azeitona

A quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) livres por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em bagaços de azeitona (ver secção 2.1.1) foi realizada através do método 2.2.1.

A tabela 3.1 apresenta os resultados obtidos para a quantificação de HT e Ty livres para as diversas campanhas de bagaços de azeitona.

**Tabela 3.1-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para os bagaços de azeitona.

<b>Bagaços de azeitona</b>						
Quantificação de HT e Ty livres por HPLC						
Concentração de HT e Ty livres (ppm)						
Data da análise	UCASUL Campanha 2013/2014		UCASUL Campanha 2014/2015	AZAL Campanha 2014/2015	AZAL Campanha 2015/2016	
	HT livre	Ty livre	HT livre	HT livre	HT livre	Ty livre
29-01-2015			240	10		
06-03-2015				160		
27-03-2015				35		
17-04-2015			890	360		
24-04-2015			900	430		
05-05-2015				400		
20-05-2015			880	310		
08-06-2015			950	500		
15-06-2015			910	570		
16-07-2015				590		
08-10-2015	1550					
16-10-2015				430		
24-11-2015						
15-01-2016	1500	300			700	400
18-02-2016	1650	250				
01-03-2016				420	1700	430

O cromatograma para o bagaço UCASUL no dia 16-10-2015 pode ser visto como exemplo no Anexo A.

#### 3.2 Nanofiltração de extrato de bagaço de azeitona- ensaios de laboratório

O bagaço de azeitona utilizado neste ensaio foi o AZAL Campanha 2015/2016. Que está mencionado na secção 2.1.1.

Este ensaio foi feito segundo o método 2.2.2.

Antes de se iniciar o ensaio de nanofiltração em escala piloto, efetuou-se a malaxação, num reator piloto, durante 1 hora. A figura 3.1 mostra esse processo a ser executado em escala piloto.



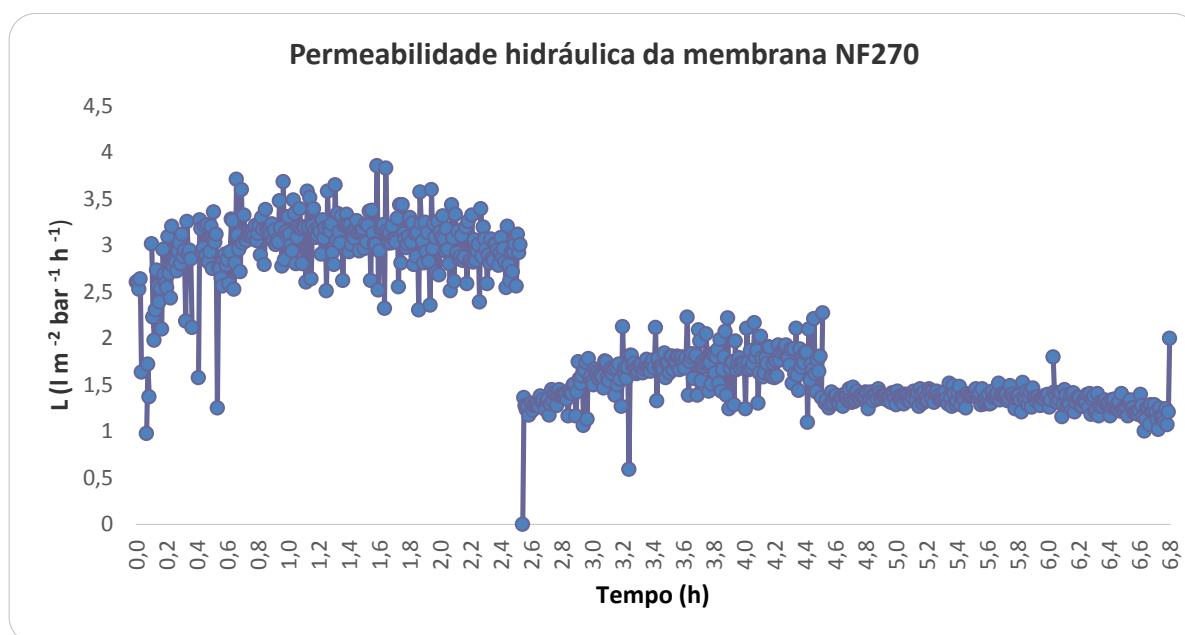
**Figura 3.1-** Reator piloto para ensaiar malaxação do bagaço de azeitona.

Após a malaxação, com o auxílio de uma meia de vidro extraiu-se a fase aquosa para se proceder à centrifugação (a centrifugação não foi feita no âmbito deste trabalho).

Após a centrifugação deu-se início à nanofiltração utilizando duas membranas, NF270 e DK, com o fim de testar qual a melhor membrana, ou seja, mediu-se a permeabilidade hidráulica.

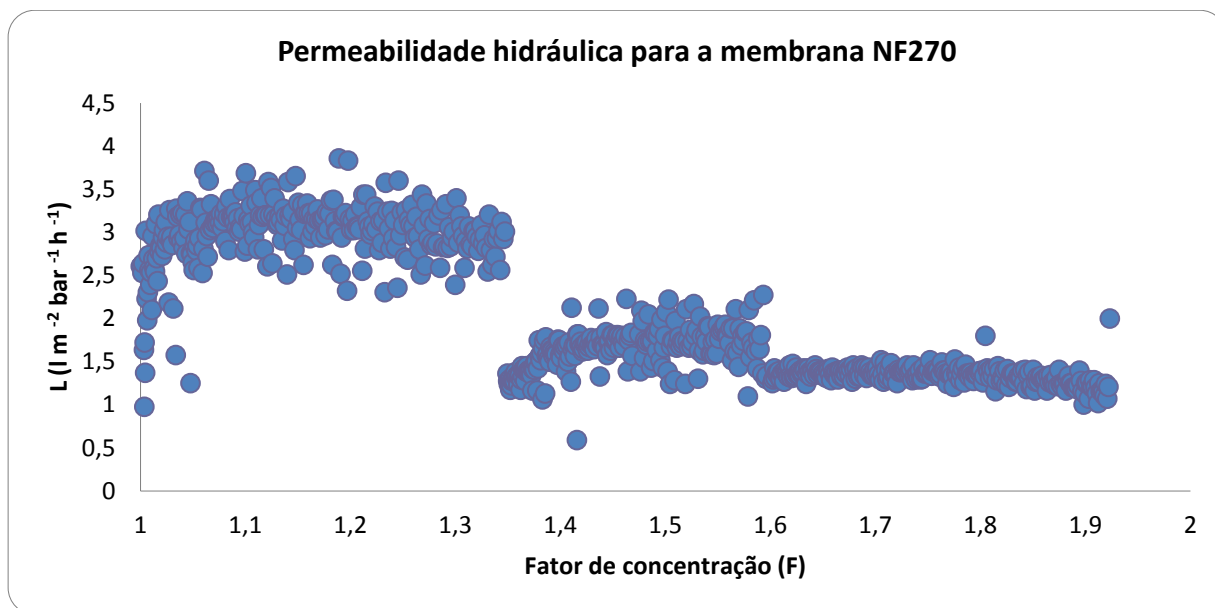
### 3.2.1 Permeabilidade hidráulica da Membrana NF270

A figura 3.2. apresenta a permeabilidade da membrana NF270 em função do tempo.



**Figura 3.2-** Permeabilidade hidráulica para a membrana NF270 em função do tempo.

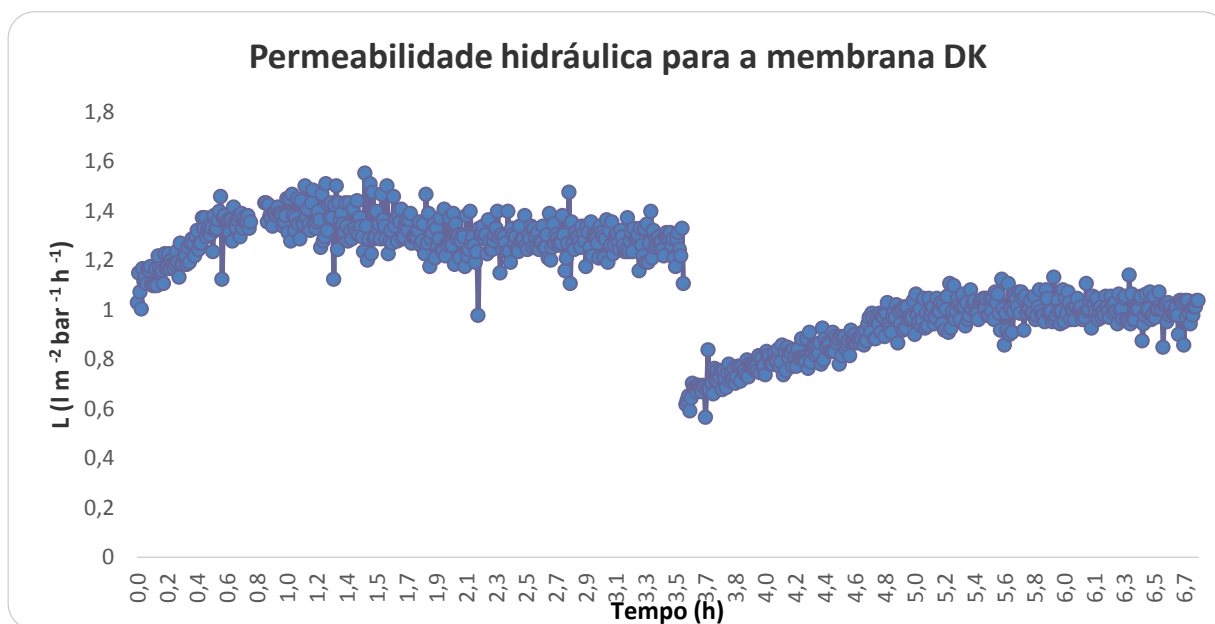
A figura 3.3. apresenta a permeabilidade para a membrana NF270 em função do fator de concentração.



**Figura 3.3-** Permeabilidade hidráulica em função do fator de concentração para a membrana NF270.

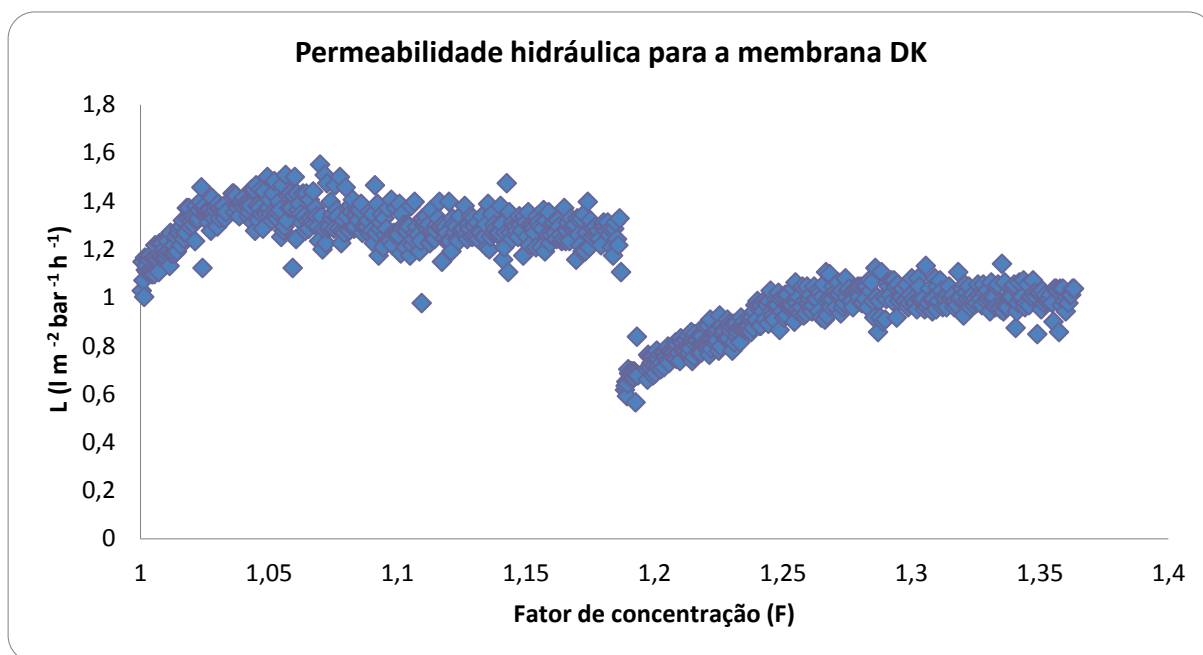
### 3.2.2 Permeabilidade hidráulica da Membrana DK

A figura 3.4. apresenta a permeabilidade da membrana DK em função do tempo.



**Figura 3.4--** Permeabilidade hidráulica em função do tempo para a membrana DK.

A figura 3.5. apresenta a permeabilidade para a membrana DK em função do fator de concentração.



**Figura 3.5-** Permeabilidade hidráulica em função do fator de concentração para a membrana DK.

### 3.2.3 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres durante o processo de nanofiltração

Procedeu-se à quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) livres segundo o método 2.2.2. A tabela 3.2 apresenta os resultados obtidos de cada amostra nas diferentes fases do processo.

**Tabela 3.2-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para as diferentes fases do processo de nanofiltração de extrato de bagaço de azeitona.

Nanofiltração de extrato de bagaço de azeitona				
Quantificação de HT e Ty livres por HPLC				
Concentração de HT e Ty livres (ppm)				
	Membrana NF270		Membrana DK	
	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre
<b>Alimentação da nanofiltração</b>	1440	640	1440	640
<b>Nanofiltrado</b>	1110	170	1300	220

### 3.3 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres durante o processo de osmose inversa do nanofiltrado da membrana NF270

Procedeu-se à quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) livres segundo o método 2.2.3. A tabela 3.3 apresenta os resultados obtidos de cada amostra nas diferentes fases do processo.

**Tabela 3.3-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para as diferentes fases do processo de osmose inversa do nanofiltrado da membrana NF270.

Osmose inversa com nanofiltrado da membrana NF270		
Quantificação de HT e Ty livres por HPLC		
Concentração de HT e Ty livres (ppm)		
	HT livre	Ty livre
Alimentação da osmose inversa	1110	170
Concentrado da osmose inversa	2610	490

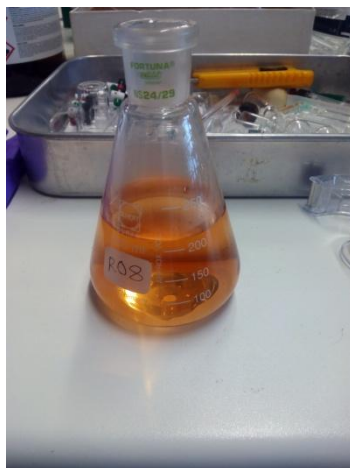
### 3.4 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em concentrados de osmose inversa

Os concentrados de osmose inversa, RO5, RO6 e RO7 (ver secção 2.1.2), no dia 21 de Setembro de 2015 (frescos) tinham a aparência apresentada na figura 3.6.

O concentrado de osmose inversa, RO8 (ver secção 2.1.2), no dia 16 de Outubro de 2015 (fresco) tinha o aspeto apresentado na figura 3.7.



**Figura 3.6-** Amostras dos concentrados de osmose inversa RO5, RO6 e RO7.



**Figura 3.7-** Amostra do concentrado de osmose inversa RO8.

A quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirisol (Ty) livres nos vários concentrados de osmose inversa foi feito segundo o método mencionado na secção 2.2.4 e os resultados obtidos podem ser vistos na tabela 3.4.

**Tabela 3.4-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para os concentrados de osmose inversa RO5, RO6, RO7 e RO8.

<b>Concentrados de osmose inversa</b>					
<b>Quantificação de HT e Ty livres por HPLC</b>					
<b>Data da análise</b>	<b>Concentração de HT e Ty livres (ppm)</b>				
	RO5	RO6	RO7	RO8	
	HT livre	HT livre	HT livre	HT livre	Ty livre
<b>22-09-2015</b>	4460	6020	5430		
<b>16-10-2015</b>				2230	
<b>11-11-2015</b>				2500	
<b>15-01-2016</b>				2560	700

### **3.4.1 Estudo da coloração dos concentrados de osmose inversa RO5, RO7 e RO8**

Este ensaio foi realizado segundo método descrito na secção 2.2.5 para os concentrados de osmose inversa RO5, RO7, RO8 (ver secção 2.1.2).

As diferentes amostras de RO5 foram preparadas no dia 25 de Setembro de 2015, com o objetivo de entender qual a melhor forma de mascarar a cor do concentrado de osmose inversa. Foram tiradas fotografias durante aproximadamente um mês para acompanhar a evolução da cor de cada amostra.

A figura 3.8 apresenta no item a) a primeira foto tirada a 28 de Setembro de 2015 e no item b) a última foto tirada no dia 23 de Outubro de 2015.





**Figura 3.8- a)** Amostras de concentrados de osmose inversa RO5 iniciais; **b)** Amostras de concentrados de osmose inversa RO5 finais.

As diferentes amostras de RO7 foram preparadas no dia 25 de Setembro de 2015. Durante sensivelmente um mês foram tiradas fotografias para acompanhar a evolução da cor nas diferentes amostras colocados em diferentes condições.

A figura 3.9 apresenta no item a) a primeira fotografia tirada no dia 29 de Setembro de 2015 e no item b) a última fotografia tirada no dia 23 de Outubro de 2015.



**Figura 3.9- a)** Amostras de concentrado de osmose inversa RO7 iniciais; **b)** Amostras de concentrado de osmose inversa RO7 finais.

Relativamente ao concentrado de osmose inversa RO8 iniciou-se o estudo no dia 2 de Novembro de 2015. Colocou-se um pouco em três *vials*, e reservou-se cada um em condições diferentes. Um foi colocado à luz, outro no escuro envolvido em papel de alumínio e um terceiro reservado no frigorífico. Estas amostras foram seguidas ao longo de vários dias. A figura 3.10 apresenta essas amostras no início e no final, passado aproximadamente um mês (no dia 4 de Dezembro de 2015).



**Figura 3.3.10- a)** Amostras de concentrado de osmose inversa RO8 na fase inicial; **b)** Amostras de concentrado de osmose inversa RO8 na fase final.

O pH do concentrado de osmose inversa RO8 foi medido segundo o método 2.2.5. O medidor de pH registou o valor 4,45 a 20°C.

### 3.4.2 Estudo do odor em concentrados de osmose inversa

Segundo análises sensoriais, os concentrados de osmose inversa possuíam um odor avinagrado (presença de ácido acético). O objetivo deste estudo foi estudar a melhor forma de retirar o ácido acético sem remover o hidroxitirosol (HT). Para isso fez-se um ensaio de adsorção com três carvões ativados, segundo o método referido na secção 2.2.8.

A quantificação de HT e tirosol (Ty) livres por HPLC está apresentada na tabela 3.5.

**Tabela 3.5-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para a adsorção com carvões ativados no concentrado de osmose inversa RO8.

Adsorção com carvões ativados no concentrado de osmose inversa RO8			
Quantificação de HT e Ty livres por HPLC			
Concentração de HT e Ty livres (ppm)			
Data da análise	GAC	BDH	HNO <sub>3</sub>
	HT e Ty livres	HT e Ty livres	HT e Ty livres
10-03-2016	nd*	nd*	nd*

\*nd- Não detetado.

### 3.5 Evaporação de concentrados de osmose inversa

A tabela 3.6 apresenta o modo de preparação de cada amostra, conforme mencionado na secção 2.2.6.

**Tabela 3.6-** Modo de preparação de amostras de concentrado de osmose inversa evaporados.

<b>Amostra de concentrado de osmose inversa evaporado</b>	<b>Temperatura do evaporador rotativo (°C)</b>	<b>Volume inicial de amostra (mL)</b>	<b>Volume final de amostra (mL)</b>
C56	35	100	20
C57	35	100	20
C58	35	100	20
C59	35	100	20
C510	35	100	20
C511	35	100	20
C61	35	100	20
C71	35	100	20
C81	35	100	10
C82	35	100	10
C83	35	100	10
C84	35	100	Secura
C85	35	100	10
C86	35	100	10
C87	35	100	10
C88	35	100	10
C89	35	100	10
C810	35	100	5
C811	35	100	5
C812	35	100	Secura
C813	60	100	Secura
C814	80	100	Secura
C815	80	100	Secura
C816	90	100	Secura
C817	80	100	Secura
C818	80	100	5
C819	35	100	10
C820	35	100	10
C821	35	200	20
C822	35	100	10
C823	35	100	5
C824	35	500	50
C825	35	100	Secura
C826	35	600	60
C827	35	100	10
C828*	35	500	50
C829	20	100	10
C830	35	500	50
<b>“RO8 dessorvido com etanol” otimizado</b>	35	35	Secura

\*Concentrado-C; Concentrado de osmose inversa-8(RO8), réplica-nº (exemplo: 28).

\*\*“RO8 dessorvido com etanol” otimizado- ver secção 2.2.9

### 3.5.1 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em concentrados de osmose inversa evaporados

A quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) livres por HPLC foi feito segundo o método mencionado na secção 2.2.7.

Nas tabelas 3.7, 3.8, 3.9 e 3.10 estão apresentados os resultados obtidos para alguns concentrados de osmose inversa evaporados mencionados na secção na tabela 3.6.

**Tabela 3.7-** Quantificação de HT livre por HPLC para os concentrados de osmose inversa RO5 evaporados.

<b>Concentrados de osmose inversa RO5 evaporados</b>						
<b>Quantificação de HT livre por HPLC</b>						
<b>Data da análise</b>	<b>Concentração de HT livre (ppm)</b>					
	C56	C57	C58	C59	C510	C511
<b>27-07-2015</b>	38 200					
<b>31-07-2015</b>	30 860	25 840	25 850	28 320	28 130	
<b>08-09-2015</b>	30 160	25 800	27 700	28 000	28 800	
<b>22-09-2015</b>						22 180
<b>6-10-2015</b>		26 240	25 590		29 480	

**Tabela 3.8-** Quantificação de HT livre por HPLC para o concentrado de osmose inversa RO6 evaporado.

<b>Concentrado de osmose inversa RO6 evaporado (C61)</b>	
<b>Quantificação de HT livre por HPLC</b>	
<b>Data da análise</b>	<b>Concentração de HT livre (ppm)</b>
	<b>HT livre</b>
<b>22-09-2015</b>	27 890

**Tabela 3.9-** Quantificação de HT livre por HPLC para o concentrado de osmose inversa RO7 evaporado.

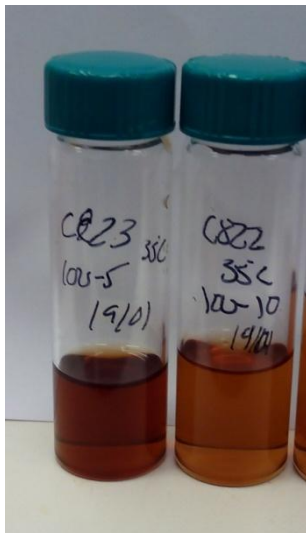
<b>Concentrado de osmose inversa RO7 evaporado (C71)</b>	
<b>Quantificação de HT livre por HPLC</b>	
<b>Data da análise</b>	<b>Concentração de HT livre (ppm)</b>
	<b>HT livre</b>
<b>22-09-2015</b>	24 950

**Tabela 3.10-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para os concentrados de osmose inversa RO8 evaporados.

<b>Concentrados de osmose inversa RO8 evaporados</b>									
<b>Quantificação de HT e Ty livres por HPLC</b>									
<b>Data da análise</b>	<b>Concentração de HT e Ty livres (ppm)</b>								
	C81	C82	C83	C84	C812		C813		C814
	HT livre				HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	Ty livre
<b>23-10-2015</b>	20 190	30 720	20 970						
<b>02-11-2015</b>				50 750					
<b>15-01-2016</b>					11 200	3000	11 970	3200	11 700 3100

### 3.5.2 Estudo da coloração e da desodorização de concentrados de osmose inversa RO8 evaporados

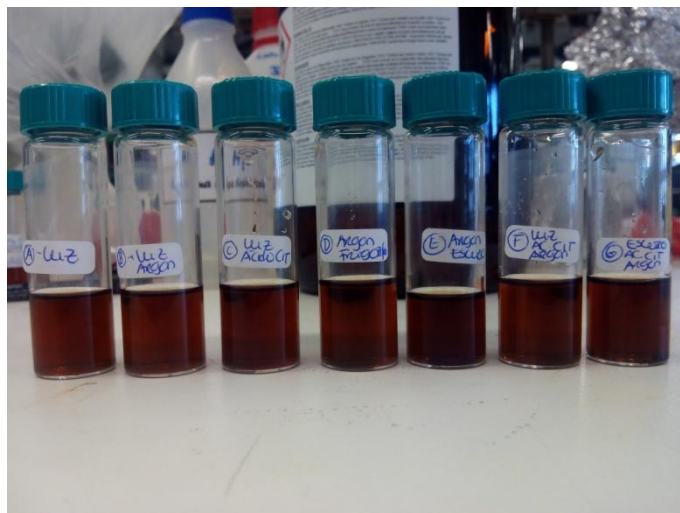
Na figura 3.11 estão representadas duas amostras de concentrado de osmose inversa RO8 evaporados, preparadas de acordo com o método mencionado na secção 2.2.6, e mais detalhadamente como estas duas amostras foram preparadas na tabela 3.6.



**Figura 3.11-** Amostras dos concentrados de osmose inversa evaporados C822 e C823 (ver tabela 3.6).

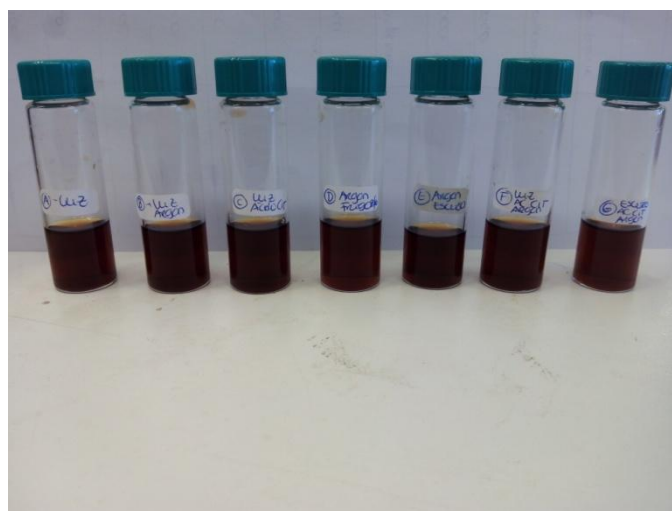
### **3.5.2.1 Concentrados de osmose inversa evaporados colocados em diversas condições**

A figura 3.12 apresenta a imagem dos *vials* no início do estudo (01-02-2016), preparadas em diversas condições de acordo com o método da secção 2.2.7, sobre o odor dos concentrados de osmose inversa evaporados em que o principal cheiro detetado era o de ácido acético, determinado por análises sensoriais, e teve como objetivo verificar a condição que melhor mascarava esse cheiro.



**Figura 3.12-** Amostras de concentrados de osmose inversa RO8 evaporados em várias condições diferentes numa fase inicial.

Para avaliar a cor destas amostras, passado ~ 1 mês tirou-se uma fotografia. A figura 3.13 apresenta as mesmas amostras, no dia 10-03-2016.



**Figura 3.13-** Amostras de extratos de RO8 concentrados em várias condições diferentes na fase final.

### 3.5.2.2 Evaporação de concentrados de osmose inversa a diferentes temperaturas e titulação de evaporados

Um outro ensaio foi feito a concentrados de osmose inversa RO8 (ver secção 2.1.2) evaporados a diferentes temperaturas conforme o método da secção 2.2.6. Mais em detalhes as amostras em questão são o C812, C813, C814, C815, C817, C818, C819 e C820 que estão apresentadas na

tabela 3.6. A amostra C816 não consta aqui, uma vez que não foi possível terminar o ensaio, pois o RO8 antes de evaporar começou a ferver muito tendo de se dar por terminada a preparação desta amostra antes do seu final.

A tentativa deste ensaio foi conseguir eliminar mais substâncias possivelmente provocadores desse odor avinagrado.

A figura 3.14 apresenta a imagem das amostras finais.



**Figura 3.14-** Amostras de alguns concentrados de osmose inversa RO8 evaporados a diferentes temperaturas.

Para este estudo, também se mediu o pH de vários concentrados de osmose inversa RO8 mencionados em cima e de mais um (C819 ver tabela 3.6), segundo o método mencionado na secção 2.2.6. A tabela 3.11 apresenta os valores medidos com o auxílio do medidor de pH.

**Tabela 3.11-** Valores de pH medidos em vários concentrados de osmose inversa RO8 evaporados.

<b>Valores de pH medidos em concentrados de osmose inversa RO8 evaporados</b>		
<b>Concentrados de osmose inversa RO8 evaporados</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>
<b>C812</b>	20	4,39
<b>C813</b>	20	4,32
<b>C814</b>	20	4,27
<b>C815</b>	20	4,45
<b>C817</b>	20	4,28
<b>C818</b>	20	4,39
<b>C819</b>	20	4,36

Também por motivos de odor, procedeu-se a uma titulação com hidróxido de sódio (NaOH) com o objetivo de neutralizar o concentrado de osmose inversa evaporado. O concentrado de osmose inversa evaporado utilizado foi o C827 (ver método na secção 2.2.6) e mais em detalhe na tabela 3.6. O volume total de NaOH (2 M) adicionado foi 16,8 mL .

### 3.5.2.3 Pervaporação de concentrados de osmose inversa evaporados

Para a desodorização de evaporados procedeu-se a uma pervaporação, segundo o método 2.2.8. O segundo ensaio foi uma adsorção com resina XAD4, através do método 2.2.9. E, finalmente, A tabela 3.12 apresenta a quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) livres por HPLC referente à pervaporação de concentrado de osmose inversa evaporado (C826 ver tabela 3.18)

**Tabela 3.12-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para a pervaporação do concentrado de osmose inversa RO8 evaporado.

Pervaporação do concentrado de osmose inversa evaporado				
Quantificação de HT e Ty livres por HPLC				
Concentração de HT e Ty livres (ppm)				
Data da análise	CRet1		CRet2	
	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre
04-02-2016	27100	10200	26400	9900

### 3.5.2.4 Adsorção com carvões ativados em evaporados

O ensaio de adsorção com três carvões ativados foi feito segundo o método 2.2.10. A tabela 3.13 apresenta a quantificação de HT e Ty livres por HPLC. (C830 ver tabela 3.6)

**Tabela 3.13-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para a adsorção com carvões ativados do concentrado de osmose inversa RO8 evaporado.

Adsorção com carvões ativados do concentrado de osmose inversa evaporado						
Quantificação de HT e Ty livres por HPLC (ppm)						
Concentração de HT e Ty livres (ppm)						
Data da análise	GAC		BDH		HNO <sub>3</sub>	
	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre
29-01-2016	16100	3900	23100	6800		
18-02-2016					6300	470

### 3.5.2.5 Adsorção com resina XAD4

A quantificação de HT e Ty livres por HPLC do concentrado de osmose inversa RO8 (ver secção 2.1.2.) obtida pela adsorção com resina XAD4 estão apresentados nas tabelas 3.14 ( com todos



os passos de dessorção), 3.15 (sem o passo de dessorção da água) e 3.16 (otimização da adsorção).

**Tabela 3.14-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC de concentrado de osmose inversa RO8 por adsorção com resina XAD4.

Adsorção com XAD4 em concentrados de osmose inversa								
	Adsorção		Dessorção					
	RO8		Dessorvido com água		Dessorvido com etanol			
	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre
Volume inicial (mL)	-		35		35		35	
Volume final (mL)	35		35		10		35	
[HT] e [Ty](ppm)	2200	700	310	60	2070	840	1390	190
Quantidade de HT e Tv (mg)	77	25	11	2	21	8	49	7

**Tabela 3.15-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC de concentrado de osmose inversa por adsorção com resina XAD4 sem o passo de dessorção com água.

Adsorção com XAD4 em concentrados de osmose inversa sem dessorção com água						
	Adsorção		Dessorção			
	RO8		Dessorvido com etanol		Não adsorvido	
	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre
Volume inicial (mL)	-		35		35	
Volume Final (mL)	35		10		35	
[HT] e [Ty] (ppm)	2200	700	2800	960	1550	200
Quantidade de HT e Ty (mg)	77	25	28	10	54	7

**Tabela 3.16-** Quantificação de HT e Ty livres de concentrado de osmose inversa da otimização da adsorção com resina XAD4.

<b>Otimização da adsorção com resina XAD4 para o RO8</b>				
Condições de operação			[HT]e [TY] não adsorvido (ppm)	
Quantidade de resina (g/L)	Temperatura (°C)	Tempo de adsorção (h)		
			HT livre	Ty livre
120	20	5	40	45
120	0	5	30	35
240	20	3	20	20

Após a quantificação de várias condições de otimização da adsorção, tomou-se a decisão de fazer a dessorção apenas à condição que melhor se adequasse.

Os resultados obtidos para adsorção da condição: dobro da resina durante 3 h, com e sem passo de dessorção com água estão apresentados nas tabelas 3.17 e 3.18.

**Tabela 3.17-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC de concentrado de osmose inversa RO8 para a condição otimizada de adsorção com resina XAD4 dobro da resina com o passo de dessorção de água.

Adsorção com resina XAD4 otimizada para o RO8								
	Adsorção		Dessorção				Não adsorvido	
	RO8		Dessorvido com água		Dessorvido com etanol			
	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre
Volume inicial (mL)	-		35		35		35	
Volume final (mL)	35		10		1		35	
[HT] e [Ty] (ppm)	2200	700	290	40	22420	7840	570	540
Quantidade de HT e Ty (mg)	77	25	2,9	0,4	22	8	20	19

**Tabela 3.18-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC de concentrado de osmose inversa RO8 para as condições otimizadas de adsorção com resina XAD4 sem o passo de dessorção de água.

Adsorção com resina XAD4 otimizada para o RO8						
	Adsorção		Dessorção		Não adsorvido	
	RO8		Dessorvido com etanol			
	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre
Volume inicial (mL)	-		35		35	
Volume Final (mL)	35		1		35	
[HT] e [Ty] (ppm)	2200	700	24630	7860	1080	130
Quantidade de HT e Ty (mg)	77	25	25	8	38	5

As tabelas 3.19 e 3.20 apresentam a quantificação de HT e Ty livre por HPLC para a adsorção com resina XAD4 do concentrado de osmose inversa evaporado (C828, ver tabela 3.18), com e sem a etapa de dessorção com água..

**Tabela 3.19-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para a adsorção com resina XAD4 em concentrado de osmose inversa evaporado com o passo de dessorção com água.

Adsorção com resina XAD4 de concentrado de osmose inversa evaporado								
	Adsorção		Dessorção					
	CRO8		Dessorvido com água		Dessorvido com etanol			
	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre
Volume inicial (mL)	-		35		35		35	
Volume final (mL)	35		35		10		35	
[HT] e [Ty](ppm)	25000	3000	1680	360	3190	5140	21870	4510
Quantidade de HT e Ty (mg)	875	105	59	13	32	51	765	158

**Tabela 3.20-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para a adsorção com resina XAD4 em concentrado de osmose inversa evaporado sem o passo de dessorção com água.

Adsorção com resina XAD4 de concentrado de osmose inversa evaporado						
	Adsorção		Dessorção		Não Adsorvido	
	CRO8		Dessorvido com etanol			
	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre
Volume inicial (mL)	-		35		35	
Volume Final (mL)	35		10		35	
[HT] e [Ty] (ppm)	25000	3000	7120	6270	21420	4490
Quantidade de HT e Ty (mg)	875	105	71	63	750	157

## 3.6 Azeites

### 3.6.1 Incorporação de concentrados de osmose inversa evaporados em azeites.

Os azeites base utilizados neste ensaio foram os mencionados na secção 2.1.3. A incorporação de concentrados de osmose inversa evaporados em azeites foi feita segundo o método 2.2.11.

A tabela 3.21 apresenta a forma com cada azeite aditivado foi preparado.

**Tabela 3.21-** Modo de preparação da incorporação de concentrados de osmose inversa em azeites aditivados.

Nome do azeite aditivado	Base do azeite utilizado	Tipo de concentrado adicionado	Turrax	Varinha	Árgon
AZHT15	AZOLS*	1% C59	10 min 24 000 rpm	X	X
AZHT15A	AZOLS*	1% C510	10 min 24 000 rpm	X	X
AZHT16	AZOLS*	2% C57	10 min 24 000 rpm	X	X
AZHT81	AZOLS*	1% C81	10 min 24 000 rpm	X	X
AZHT82	AZOLS*	1% C82	10 min 24 000 rpm	X	X
AZHT83	AZOLS*	1% C83	10 min 24 000 rpm	X	X
AZHT81t20	AZOLS*	1% C81	30 min 24 000 rpm	X	X
AZDIAHT84	DIA	0,5% C84	10 min 24 000 rpm	X	X
AZHT18semH2O	AZOLS*	1% C84	10 min 24 000 rpm	X	X
AZHT88	AZOLS*	0,375% C88	10 min 24 000 rpm	X	X
AZHT810	AZOLS*	1% C810	10 min 24 000 rpm	X	X
AZBIOHT	BIO	1% C819	10 min 24 000 rpm	X	X
AZHT811*	BIO	1% C822	10 min 24 000 rpm	X	X
AZHT812	BIO	1% C822	1 min 24 000 rpm	X	✓
AZHT813	BIO	1% C822	10 min 6500 rpm	X	✓
AZHT814	BIO	1% C822	X	10 min	✓
AZHT815	BIO	1% C823	10 min 24 000 rpm	X	✓
AZHT816	BIO	0,375% C823	10 min 24 000 rpm	X	✓
AZHT821	AZOLS	1% C825	10 min 24 000 rpm	X	✓
AZHT822	AZOLS	1% C826	10 min 24 000 rpm	X	✓
AZHT823	AZOLS	1% CRet1**	10min 24 000 rpm	X	X
AZHT824	Arbequina	1% CRet2**	1min 24 000 rpm	X	X
AZHT825	Arbequina	1% CRet2**	10 min 24 000 rpm	X	X
AZHT826	Arbequina	1% “RO8dessorvido com etanol” otimizado***	1 min 24 000 rpm	X	X

\*AZOLS- Azeite Oliveira da Serra Virgem Extra.

\*\*CRet1 e CRet2 (pervaporados; ver secção 2.2.8).

\*\*\*RO8ADS(concentrado de osmose inversa evaporado dessorvido com etanol na etapa de otimização de adsorção com resina XAD4).

Da mesma forma se prepararam azeites aditivados emulsionados (ver método 2.2.11).

A tabela 3.22 apresenta a forma de incorporação de concentrados de osmose inversa evaporados e de emulsionantes a azeites base.

**Tabela 3.22-** Modo de preparação da incorporação de concentrados de osmose inversa em azeites aditivados emulsionados.

Nome do azeite aditivado	Base do azeite utilizado	Tipo de concentrado	Turrax	Varinha	Árgon
AZHT3	AZOLS*	1% C56 1% Span20 1% C57	10 min 24 000 rpm		X
AZHT9	AZOLS*	70:30 Span 20: Tween 85	10 min 24 000 rpm		X
AZHT17	AZOLS*	1% C58 1% GMO	10 min 24 000 rpm	X	X
AZHT20	AZOLS*	1% C88 2% Span 20	10 min 13 500 rpm	X	X
AZHT21	AZOLS*	1% C89 4% Span 20	10 min 13 500 rpm	X	X
AZHT22	AZOLS*	2% C88 2% Span20	10 min 13 500 rpm	X	X
AZHT817	BIO	2% C823 2% Span20	10 min 24 000 rpm	X	✓
AZHT818	BIO	2% C823 2% GMO	10 min 24 000 rpm	X	✓
AZHT819	BIO	1% C823 2% Span20	10 min 24 000 rpm	X	✓
AZHT820	BIO	1% C823 2% GMO	10 min 24000 rpm	X	✓

### 3.6.2 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em azeites base e azeites aditivados não emulsionados

A quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) livres para os azeites base (ver secção 2.1.3) e azeites aditivados (ver tabela 3.21 e 3.22) foi realizada de acordo com o método 2.2.12.

A quantificação de HT e Ty livres nos azeites base está apresentada na tabela 3.23.

**Tabela 3.23-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para os azeites base.

<b>Azeites base</b>								
<b>Quantificação de HT e Ty livres por HPLC</b>								
<b>Concentração de HT e Ty livres (ppm)</b>								
<b>Data da análise</b>	<b>AZOLS</b>	<b>AZDIA</b>	<b>AZALBIO</b>		<b>AZAL Arbequina</b>		<b>AZAL Galega</b>	
	HT livre	HT livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre
<b>22-09-2015</b>	-							
<b>28-09-2015</b>	5							
<b>06-10-2015</b>	10							
<b>02-11-2015</b>		5						
<b>29-01-2016</b>			20	15				
<b>04-02-2016</b>								
<b>01-03-2016</b>			5	10	0,4	4	-	nd*

\*nd- Não detetado.

O cromatograma relativo ao azeite base AZOLS no dia 22-09-2015 pode ser visto como exemplo no Anexo A.

De seguida seguem-se as quantificações de HT e Ty livres para vários azeites aditivados sem emulsionante.

O azeite aditivado AZHT15 (ver tabela 3.21) foi preparado no dia 10 de Setembro de 2015. A quantidade de HT e Ty livres presentes no azeite aditivado foi seguida ao longo de 7 meses. Os resultados podem ser observados na tabela 3.24.

**Tabela 3.24-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para o azeite aditivado AZHT15.

<b>Azeite aditivado AZHT15</b>		
<b>Quantificação de HT e Ty livres por HPLC</b>		
<b>Data da análise</b>	<b>Concentração de HT e Ty livres (ppm)</b>	
	<b>HT livre</b>	<b>Ty livre</b>
<b>22-09-2015</b>	87	X
<b>23-09-2015</b>	80	X
<b>28-09-2015</b>	83	X
<b>12-10-2015</b>	76	X
<b>29-10-2015</b>	78	X
<b>10-11-2015</b>	70	X
<b>16-11-2015</b>	79	X
<b>12-01-2016</b>	47	80
<b>03-02-2016</b>	15	56
<b>29-02-2016</b>	11	X

\*nd- Não detetado

Os cromatogramas do AZHT15 nos dias 22-09-2015 e 02-11-2015 podem ser vistos como exemplos no Anexo A.

Retirou-se um pouco desse azeite e colocou-se no frigorífico. A tabela 3.25 apresenta a quantificação de HT e Ty livres por HPLC para essa condição.

**Tabela 3.25-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para o azeite aditivado AZHT15 que esteve no frigorífico.

<b>Azeite aditivado AZHT15 no frigorífico</b>		
<b>Quantificação de HT livre e Ty livre por HPLC</b>		
<b>Data da análise</b>	<b>Concentração de HT e Ty livres (ppm)</b>	
	<b>HT livre</b>	<b>Ty livre</b>
<b>02-11-2015</b>	63	X
<b>11-11-2015</b>	61	X
<b>29-01-2016</b>	14	32
<b>01-03-2016</b>	17	34

Após a produção do azeite aditivado AZHT15 foram realizadas repetições para poder observar a reprodutibilidade desse azeite.

A tabela 3.26 mostra as datas de preparação de azeites aditivados feitos da mesma forma do azeite AZHT15.

**Tabela 3.26-** Data de reproduções do azeite aditivado AZHT15.

<b>Data de preparação de azeites aditivados</b>	
<b>Azeites aditivados</b>	<b>Data de preparação</b>
<b>AZHT15A</b>	30-09-2015
<b>AZHT81</b>	20-10-2015
<b>AZHT82</b>	20-10-2015
<b>AZHT83</b>	20-10-2015

A quantificação de HT e Ty livres por HPLC para os azeite aditivados que serviram para reproduzir o azeite AZHT15 (ver tabela 3.21) está apresentada na tabela 3.27.

**Tabela 3.27-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para os azeites aditivados que serviram de reprodução do azeite AZHT15.

<b>Reproduções do azeite aditivado AZHT15</b>						
<b>Quantificação de HT e Ty livres por HPLC</b>						
<b>Data da análise</b>	<b>Concentração de HT e Ty livres (ppm)</b>					
	<b>AZHT15A</b>	<b>AZHT81</b>		<b>AZHT82</b>		<b>AZHT83</b>
	HT livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre
<b>08-10-2015</b>	49					
<b>14-10-2015</b>	94					
<b>23-10-2015</b>		180	X	156	X	141
<b>02-11-2015</b>		94	X	79	X	72
<b>11-11-2015</b>		96	X	65	X	67
<b>24-11-2015</b>		90	X	63	X	57
<b>29-01-2016</b>				7	28	
<b>10-03-2016</b>		20	24			

### 3.6.3 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres feitas na FF/UL

Foram previamente preparadas duas amostras: Azeite Oliveira da Serra Virgem Extra (AZOLS, ver secção 2.1.3) e azeite aditivado AZHT15 (ver tabela 3.21) em duplicado, segundo o método referido na secção 2.2.12. De seguida essas amostras foram enviadas para a Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para quantificação de hidroxitirosol e tirosol totais.

O azeite AZHT15 foi preparado incorporando um concentrado de osmose inversa rico em hidroxitirosol ao azeite base AZOLS, com o objetivo de aumentar a concentração deste composto no produto final.

Foi adicionado ao azeite um concentrado de extrato natural com cerca de 25 000 ppm de hidroxitirosol (HT) livre, com uma razão de 1:100 (p/p). Após a decantação, o azeite rico em HT, AZHT15 foi comparado com o AZOLS.

As áreas obtidas dos cromatogramas (Anexo B) para o hidroxitirosol (HT) livre e seus derivados e para o tirosol (Ty) livre e seus derivados estão apresentados na tabela 3.28.

**Tabela 3.28-** Identificação de cada composto e respetiva área do pico (U.A.) feita na FF/UL.

Referência	Composto	Azeite	
		AZHT15	AZOLS
153	<b>Hidroxitirosol (3,4-DHPEA)</b>	13616488	958363
319	<b>3,4-DHPEA-EDA</b>	392282	2403347
333	<b>Metil-D- aglicone oleuropeína</b>	221481	1459930
377	<b>3,4-DHPEA-EA</b>	1384791	2948883
391	<b>Metil aglicone oleuropeína</b>	391674	919186
393	<b>10-Hidroxi aglicone oleuropeína</b>	3960144	2106591
335	<b>Hidroxi-D- aglicone oleuropeína</b>	2888865	568402
137	<b>Tirosol (p-HPEA)</b>	3411087	1826296
303	<b>p-HPEA-EDA</b>	196968	233874
361	<b>p-HPEA-EA</b>	787038	895615
365	<b>Derivado de oleuropeína</b>	385420	207245

A quantificação de HT e Ty livres feitas por HPLC-MS (FF/UL) pode ser observada na tabela 3.29.

**Tabela 3.29-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC-MS feito na FF/UL.

Referência	Composto	Azeite	
		Concentração (ppm)	
		AZOLS	AZHT15
153	<b>Hidroxitirosol (3,4-DHPEA)</b>	5	71
137	<b>Tirosol (p-HPEA)</b>	9	16



Em termos de comparação, a tabela 3.30 regista os valores obtidos na quantificação de HT livre por HPLC feita na FCT/UNL e a quantificação de HT e Ty livres feita por HPLC-MS feita na FF/UL.

**Tabela 3.30-** Comparação de resultados obidos na FCT/UNL e na FF/UL.

Azeite	HPLC (FCT/UNL)	HPLC-MS (FF/UL)	
	[HT] livre (ppm)	[HT] livre (ppm)	[Ty] livre (ppm)
AZHT15	80	71	16
AZOLS	2-10	5	9

### 3.6.4 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol totais por HPLC em azeites base e azeites aditivados

Em primeiro lugar e com base na tabela 3.29 a quantificação total feita na FF/UL pode ser observada na tabela 3.31.

**Tabela 3.31-** Quantificação de HT e Ty totais por HPLC-MS feita na FF/UL.

Referência	Composto	Azeite	
		Concentração (ppm)	
		AZOLS	AZHT15
153	Hidroxitirosol (3,4-DHPEA)	4,7	71,3
319	3,4-DHPEA-EDA	9	5
333	Metil-D aglicone oleuropeína	7	1
377	3,4-DHPEA-EA	15	8
391	Metil aglicone oleuropeína	4	1
393	10-Hidroxi aglicone oleuropeína	12,9	16,4
335	Hidroxi-D- aglicone oleuropeína	4	1
137	Tirosol (p-HPEA)	9,3	16,4
303	p-HPEA-EDA	1	1
361	p-HPEA-EA	4	2
365	Derivado de oleuropeína	1	1
	<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>125</b>

Os cromatogramas de HT e seus derivados e Ty e seus derivados podem ser vistos no anexo B. A tabela 3.32 apresenta a quantificação de HT e seus derivados e Ty e seus derivados

**Tabela 3.32-** Quantificação de HT e Ty totais por HPLC-MS resumidos feitos na FF/UL.

Azeite	HPLC-MS (FF/UL)		
	[HT] + derivados (ppm)	[Ty] + derivados (ppm)	[HT]+[Ty] (ppm)
<b>AZHT15</b>	104	20	124
<b>AZOLS</b>	57	15	72

Para a quantificação de HT e Ty totais por HPLC no azeite aditivado AZHT15 e AZHT81 (ver tabela 3.21), feita na FCT/UNL, foi realizado um ensaio de hidrólise ácida, segundo o método 2.2.13.

A tabela 3.33 apresenta a quantificação de HT e Ty totais por HPLC para esses dois azeites.

**Tabela 3.33-** Quantificação de HT e Ty totais por HPLC para os azeites AZHT15 e AZHT81.

Hidrólise ácida aos azeites aditivados AZHT15 e AZHT81				
Quantificação de HT e Ty totais				
Concentração de HT e Ty livres (ppm)				
Data da análise	AZHT15		AHT81	
	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre
<b>24-11-2015</b>	105	X		
<b>10-03-2016</b>	60	110	75	90

### 3.6.5 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em azeites aditivados emulsionados

A preparação de todos os azeites aditivados emulsionados foi feita segundo o método 2.2.11. Estes azeites, mais em detalhe, podem ser consultados na tabela 3.22.

A tabela 3.34 apresenta a data de preparação dos azeites aditivados emulsionados bem como o seu emulsionante incorporado.

**Tabela 3.34-** Data de preparação e incorporação em azeites aditivados emulsionados

Data de preparação e incorporação dos azeites aditivados emulsionados		
Azeite	Incorporação	Data de preparação
AZHT3	1% C56	28-07-2015
	1% Span 20	
AZHT9	1% C57	28-07-2015
	70:30 Span 20:Tween 85	
AZHT17	1% C58	02-10-2015
	1% GMO	
AZHT20	1% C88	12-11-2015
	2% Span 20	
AZHT21	1% C89	12-11-2015
	4% Span 20	
AZHT22	2% C88	12-11-2015
	2% Span 20	
AZHT817	2% C823	22-01-2016
	2% Span 20	
AZHT818	2% C823	22-01-2016
	2% GMO	
AZHT819	1% C823	22-01-2016
	2% Span 20	
AZHT820	1% C823	22-01-2016
	2% GMO	

A quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) livres por HPLC pode ser observada na tabela 3.35.

**Tabela 3.35-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para azeites aditivados emulsionados.

Azeites aditivados emulsionados																
Quantificação de HT e Ty livres por HPLC																
Data da análise	Concentração de HT e Ty livres (ppm)															
	AZHT 3	AZHT 9	AZHT 17		AZHT 20	AZHT 21	AZHT 22		AZHT 817		AZHT 818		AZHT 819		AZHT 820	
	HT livre	HT livre	HT livre	Ty livre	HT livre	HT livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre
08-10-2015	40	40	50	X	110	60	180	X	100	60	40	50	50	30	55	30
16-10-2015			100	X												
24-11-2015																
29-01-2016																
10-03-2016			25	30												

### 3.6.6 Quantificação de hidroxitirosol e tirosol livres em azeites incorporados com diferentes quantidades de concentrados de osmose inversa evaporados

Os azeites aditivados com diferentes quantidades de concentrados de osmose inversa evaporados foram preparados segundo o método 2.2.11. Os azeites em questão podem ser consultados detalhadamente na tabela 3.21.

A tabela 3.36 apresenta a data de preparação dos azeites em questão, bem como a incorporação feita.

**Tabela 3.36-** Data de preparação e de azeites aditivados incorporados com diferentes quantidades de evaporados.

Azeites aditivados incorporados com diferentes quantidades de evaporados			
Azeite	Data de preparação	Tipo de evaporação	Quantidade de evaporado
AZHT16	02-10-2015	Até 20% (RO5)	2%
AZHT81	20-10-2015	Até 10% (RO8)	1%
AZHT18CsemH2O	26-10-2015	Secura (RO8)	1%
AZHT88	06-11-2015	Até 10% (RO8)	0,375%
AZHT810	12-11-2015	Até 5% (RO8)	1%
AZH815	20-01-2016	Até 5% (RO8)	1%
AZHT816	20-01-2016	Até 5% (RO8)	0,375%

A tabela 3.37 apresenta a quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) livres por HPLC para os seguinte azeites aditivados.

**Tabela 3.37-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para azeites aditivados incorporados com diferentes quantidades de concentrados de osmose inversa evaporados.

Azeites aditivados com diferentes quantidades de concentrados RO8 evaporados												
Quantificação de HT e Ty livres por HPLC												
Data da análise	Concentração de HT e Ty livres (ppm)											
	AZHT16		AZHT81		AZHT18CsemH2O	AZHT88	AZHT810		AZHT815		AZH816	
	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	HT livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre
08-10-2015	55	X	180	X	20	40						
16-10-2015	110	X										
02-11-2015			94	X								
11-11-2015	85	X	96	X								
24-11-2015	90	X	90	X		42	105	X				
29-01-2016							20	32	40	25	25	15
10-03-2016	30	40	20	25				21	27			

### 3.6.7 Preparação de azeites aditivados para otimização da incorporação do concentrado de osmose inversa evaporado

Na tabela 3.38 estão apresentados os azeites aditivados preparados com o fim de otimizar a incorporação dos concentrados de osmose inversa RO8( ver secção 2.1.2) evaporados que foram preparados de acordo com o método 2.2.11. Para o ensaio estudaram-se as incorporações a diferentes tempos e diferentes rotações. Os azeites em questão podem ser consultados na tabela 3.21.

**Tabela 3.38-** Azeites aditivados preparados para otimização da incorporação do concentrado de osmose inversa RO8 evaporado.

Detalhes de preparação da incorporação e temperatura obtida após agitação					
Nome do azeite	Data de preparação	Turrax		Varinha mágica	
		Tempo (min)	Rotações (rpm)	Tempo (min)	Motor (W)
AZHT81t20	20-10-2015	20	24 000		X
AZHT811	19-01-2016	10	24 000		X
AZHT812	19-01-2016	1	24 000		X
AZHT813	20-01-2016	10	6500		X
AZHT814	20-01-2016		X	10	500

A tabela 3.39 apresenta as diversas temperaturas que os azeites atingiram no momento final da incorporação.

**Tabela 3.39-** Temperatura atingida no final da incorporação em azeites aditivados.

Temperatura da incorporação nos azeites	
Azeite aditivado	Temperatura (°C)
AZHT811	70
AZHT812	20
AZHT813	25
AZHT814	40
AZHT815	54
AZHT816	70
AZHT817	89
AZHT818	78
AZHT819	68
AZHT820	70
AZHT821	83
AZHT822	75
AZHT823	84

A tabela 3.40 apresenta a quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) livres nos azeites aditivados para a otimização da incorporação de concentrado de osmose inversa evaporado.

**Tabela 3.40-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC de azeites aditivados para otimização da incorporação do concentrado de osmose inversa evaporado.

<b>Otimização da incorporação de concentrados evaporados nos azeites</b>									
<b>Quantificação de HT Ty livres por HPLC</b>									
<b>Data da análise</b>	<b>Concentração de HT e Ty livres (ppm)</b>								
	<b>AZHT81t20</b>	<b>AZHT811</b>		<b>AZHT812</b>		<b>AZHT813</b>		<b>AZHT814</b>	
	HT livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre
<b>02-11-2015</b>	20	X							
<b>29-01-2016</b>		20	15	20	15	18	16	19	16
<b>04-02-2016</b>		50	30	21	30				

### 3.6.8 Estudo da coloração e turvação de azeites aditivados

Para este ensaio utilizaram-se dois azeites aditivados preparados segundo o método 2.2.11.

O primeiro azeite serviu para estudar a cor e o segundo a turvação.

A figura 3.15 apresenta o azeite aditivado AZHT811 (ver tabela 3.21). Apesar de só apresentar uma garrafa, a fotografia foi tirada no dia inicial do ensaio (19-01-2016). As restantes garrafas tinham a mesma cor e o mesmo aspeto, uma vez que se trata do mesmo azeite.



**Figura 3.15-** Azeite aditivado AZHT811 no início do estudo da coloração de um azeite aditivado.

A figura 3.16 apresenta a imagem no final do estudo da coloração de um azeite aditivado (10-03-2016). O estudo prolongou-se durante sensivelmente dois meses.



**Figura 3.16-** Azeite aditivado AZHT811 no final do estudo da coloração de um azeite aditivado.

O azeite que serviu de base para o estudo da turvação foi o AZHT816. Foi preparado segundo o método 2.2.11 e dividiu-se em duas garrafas, onde numa delas adicionou-se *molecular sieve*. O *molecular sieve* é um material poroso de tamanho uniforme. Os diâmetros destes poros são de dimensões de moléculas pequenas, ou seja, as moléculas grandes não podem ser adsorvidas, mas as pequenas podem.

Passado uma semana o resultado apresentado encontra-se na figura 3.17.



**Figura 3.17-** Azeite aditivado AZHT816 com e sem *molecular sieve*.

A quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) do azeite AZHT816 (ver tabela 3.21) pode ser vista na tabela 3.36. A tabela 3.41 apresenta a concentração de HT e Ty para o mesmo azeite, mas parte foi colocado à parte e foi-lhe adicionado *molecular sieve* com o fim de absorver a água deixando ficar o hidroxitirosol.

O objetivo deste ensaio foi tentar tirar a turvação e aclarar o azeite que é provocada pela utilização do instrumento *Turrax* (IKA).

**Tabela 3.41-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para o azeite AZHT816 com *molecular sieve*.

<b>Azeite AZHT816ms</b>		
<b>Quantificação de HT e Ty livres por HPLC</b>		
<b>Data da análise</b>	<b>Concentração de HT e Ty livres (ppm)</b>	
	<b>HT livre</b>	<b>Ty livre</b>
<b>04-02-2016</b>	4	16
<b>18-02-2016</b>	0,4	5

### 3.6.9 Azeite incorporado com evaporado em base de glicerol e com retentado

#### 3.6.9.1 Azeite incorporado com evaporado em base de glicerol

Ensaiou-se uma incorporação, segundo o método 2.2.11, de um evaporado em que a sua base em vez de ser água, como todos os outros evaporados ensaiados ao longo deste trabalho, passou a ser glicerol (AZHT821, ver tabela 3.21).

A tabela 3.42 apresenta a quantificação de hidroxitirosol (HT) livre e tirosol (Ty) para este azeite incorporado com evaporado em base de glicerol.

**Tabela 3.42-** Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para o azeite aditivado AZHT821.

<b>Azeite com evaporado em base de glicerol</b>		
<b>Quantificação de HT e Ty livres por HPLC</b>		
<b>Concentração de HT e Ty livres (ppm)</b>		
<b>Data da análise</b>	<b>AZHT821</b>	
	<b>HT livre</b>	<b>Ty livre</b>
<b>29-01-2016</b>	12	16

#### 3.6.9.2 Azeite incorporado com retentado

Com o objetivo de retirar o cheiro avinagrado do concentrado de osmose inverso evaporado foi feito um ensaio de pervaporação desse evaporado. Foram feitos dois ensaios de pervaporação diferentes, mencionados de acordo com o método 2.2.8. Após esse ensaio procedeu-se à incorporação no azeite segundo o método 2.2.11. Foram preparados três azeites incorporados com esses retentados, nomeadamente o azeite AZHT822 (com o mesmo evaporado antes de ser pervaporado para fins comparativos), AZHT823, AZHT824 e AZHT825 (ver tabela 3.21).

A tabela 3.43 apresenta a data de preparação destes azeites aditivados



**Tabela 3.43-** Data de preparação de azeites aditivados com retentados.

Preparação de azeites aditivados com retentados	
Azeite	Data de preparação
AZHT822	01-02-2016
AZHT823	01-02-2016
AZHT824	01-02-2016
AZHT825	01-02-2016

A tabela 3.44 apresenta a quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (Ty) para os azeites incorporados com retentado.

**Tabela 3.44-**Quantificação de HT e Ty livres por HPLC para azeites incorporados com retentados.

Azeites aditivados com retentados								
Quantificação de HT e Ty livres por HPLC								
Data da análise	Concentração de HT e Ty livres (ppm)							
	AZHT822		AZHT823		AZHT824		AZHT825	
	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre	HT livre	Ty livre
04-02-2016	60	48	56	52	44	36	63	36
18-02-2016	33	27	33	29	33	19	28	19

### 3.6.10 Cromatografia Gasosa por *headspace* acoplado a espectrometria de massa

Apesar de a cromatografia gasosa (GC) por *headspace-MS* não ter sido realizada no âmbito deste trabalho, esta técnica foi feita com o fim de perceber os principais compostos provocadores de um cheiro/sabor menos agradável nos azeites.

Na tabela 3.45 estão apresentadas as amostras analisadas por GC.

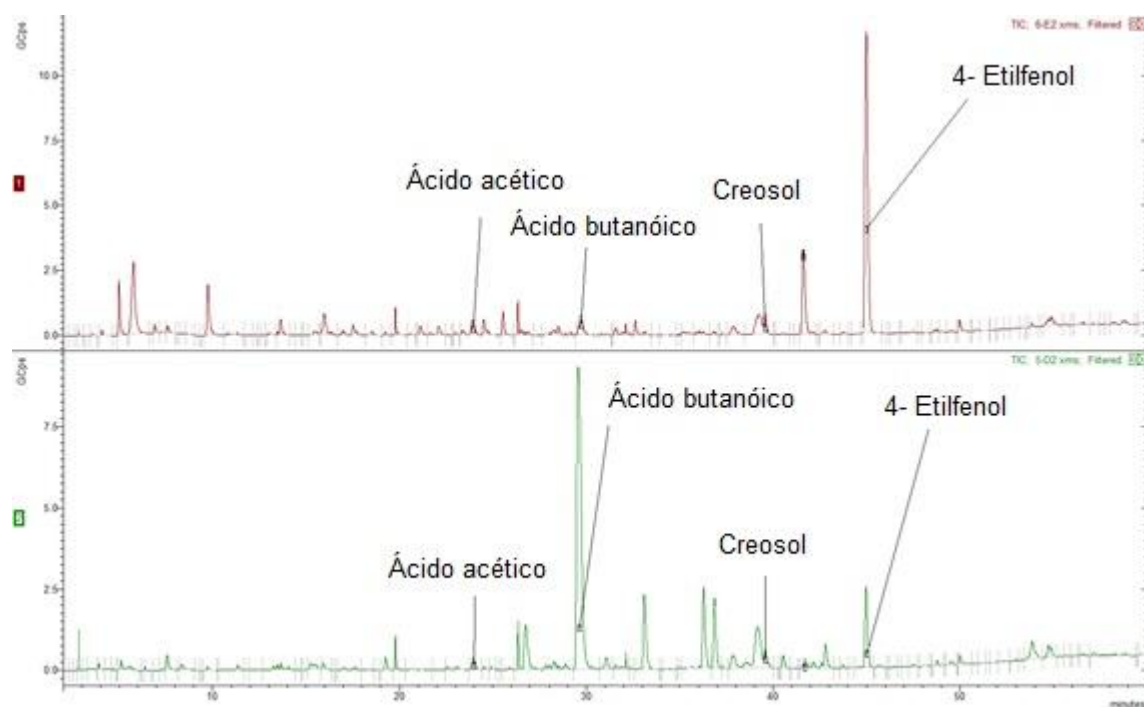
**Tabela 3.45-** Amostras analisadas em GC por *headspace*.

RO5	C86	C820	CRet1	Bagaço AZAL	RO8 dessorvido com água	CRO8 não dessorvido
C511	C87	C821	Perv1	RO8 não adsorvido (sem água)	RO8 dessorvido com etanol	CRO8 dessorvido com água
RO8	C811	AZHT824	CRet2	RO8 dessorvido com etanol (sem água)	CRO8 não adsorvido (sem água)	RO8 dessorvido com etanol
C85	C812	C826	Bagaço UCASUL	RO8 não adsorvido	CRO8 dessorvido com etanol (sem	

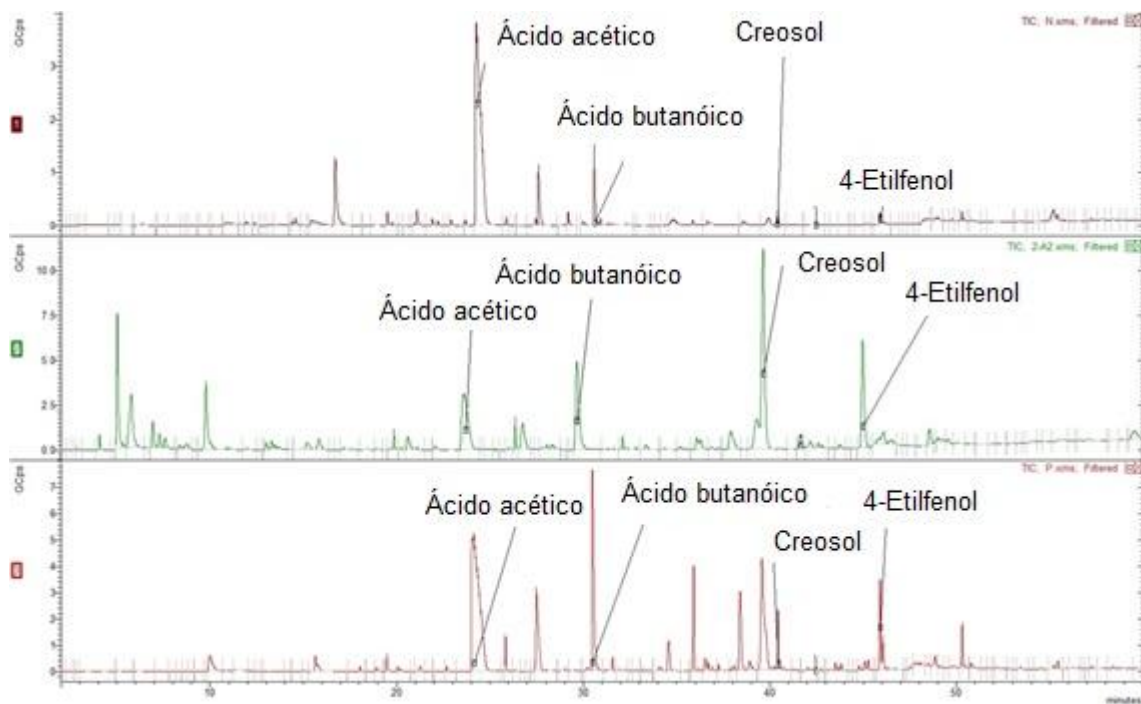
					água)	
--	--	--	--	--	-------	--

Nas figuras 3.18, 3.19 e 3.20 podem ser observados alguns cromatogramas efetuados em GC por *headspace*.

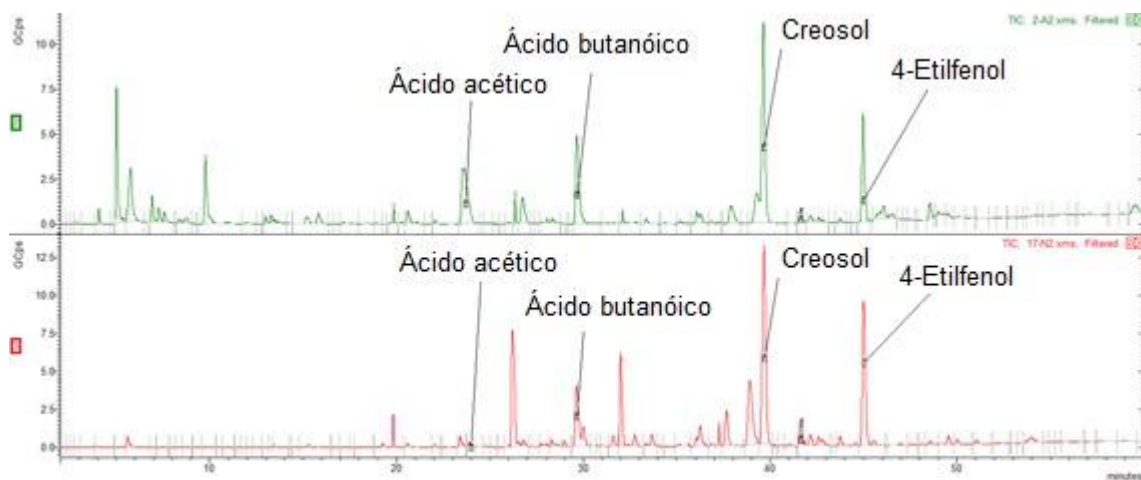
As áreas dos picos de alguns compostos provocadores de mau odor encontram-se apresentadas no anexo C.



**Figura 3.18-** Cromatogramas de GC para a amostra de bagaço de azeitona AZAL Campanha 2015/2016 (cima) e concentrado de osmose inversa RO8 (baixo).



**Figura 3.19-** Cromatogramas de GC para o AZHT824 (cima), concentrado de osmose inversa RO8 (meio) e retentado CRet1 (baixo).



**Figura 3.20-** Cromatograma de GC para o concentrado de osmose inversa RO8 (cima) e para o evaporado dessorvido com etanol (incluindo a etapa de dessorção com água) (baixo).

As áreas dos picos de todas as amostras analisadas podem ser consultadas em Anexo (Anexo C).



## **4 Discussão de resultados**

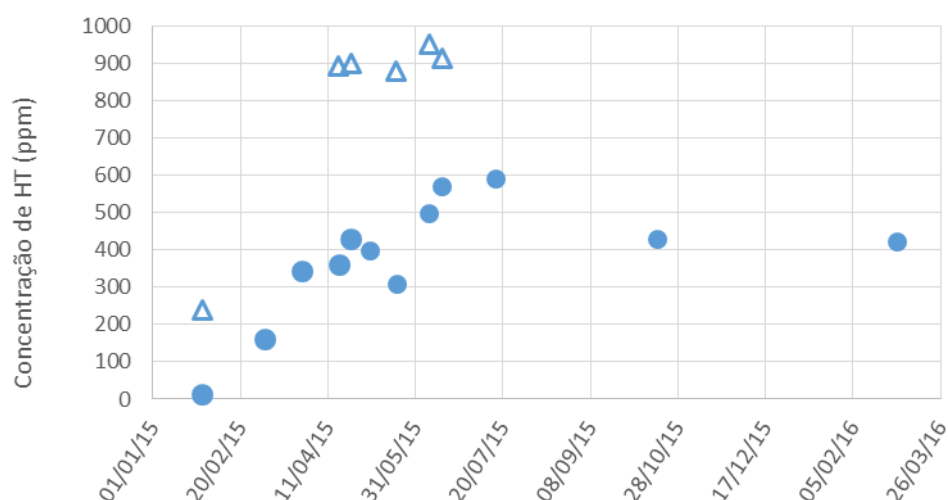
A discussão dos resultados experimentais obtidos no âmbito desta dissertação, irá centrar-se em três pontos fundamentais para o desenvolvimento de um azeite aditivado com hidroxitirosol (HT), que é o seu principal objetivo. O primeiro ponto consiste na qualidade do concentrado de osmose inversa de hidroxitirosol (HT) obtido, que depende diretamente da qualidade da matéria-prima e da eficácia do processo de produção. O segundo ponto consiste no método utilizado para a incorporação do concentrado de osmose inversa no azeite, do qual depende a estabilidade do produto final ao longo do tempo. Por fim, abordamos as soluções encontradas para reduzir alguns defeitos apontados aos azeites aditivados e que se prendem principalmente com a presença de ácido acético no concentrado de osmose inversa.

### **4.1 Qualidade do extrato rico em hidroxitirosol**

#### **4.1.1 Matéria-prima**

Os extratos naturais ricos em hidroxitirosol (HT) estudados neste trabalho, foram obtidos a partir de bagaços de azeitona recolhidos na AZAL e UCASUL em diferentes campanhas (2013/2014 a 2015/2016). De acordo com métodos já otimizados no laboratório de acolhimento e descritos na secção 2.2.1, os bagaços foram extraídos com água e o extrato analisado por HPLC para determinação da sua composição em HT. Os resultados estão apresentados na secção 3.1, tabela 3.1.

Um dos bagaços utilizados neste trabalho foi recolhido nas instalações industriais da UCASUL em Julho de 2014 (referente à campanha de 2013/2014) e armazenado à temperatura ambiente num contentor fechado no laboratório. O conteúdo em HT de um extrato aquoso obtido a partir deste bagaço é de aproximadamente 1700 ppm. O teor em HT deste bagaço manteve-se estável ao longo do tempo e está de acordo com resultados obtidos anteriormente no laboratório de acolhimento e também com resultados encontrados na literatura para estudos semelhantes [1]. No entanto, e ao contrário do que seria de esperar, o bagaço recolhido nas instalações da AZAL referente à campanha de 2014/2015, ano em que se iniciou a produção industrial do extrato, começou por apresentar valores muito baixos em HT de aproximadamente 12 ppm. Uma vez que está descrito na literatura que a quantidade de HT presente nos bagaços vai aumentando ao longo do tempo, devido à hidrólise de compostos derivados da família dos secoridóides, a evolução da concentração de HT foi monitorizada. Para além disso, e para aferir se seria um problema apenas do bagaço da AZAL foram-se recolhendo amostras de bagaço da UCASUL (referente à mesma campanha de 2014/2015). Os resultados obtidos para os diferentes bagaços foram comparados como está ilustrado na figura 4.1.

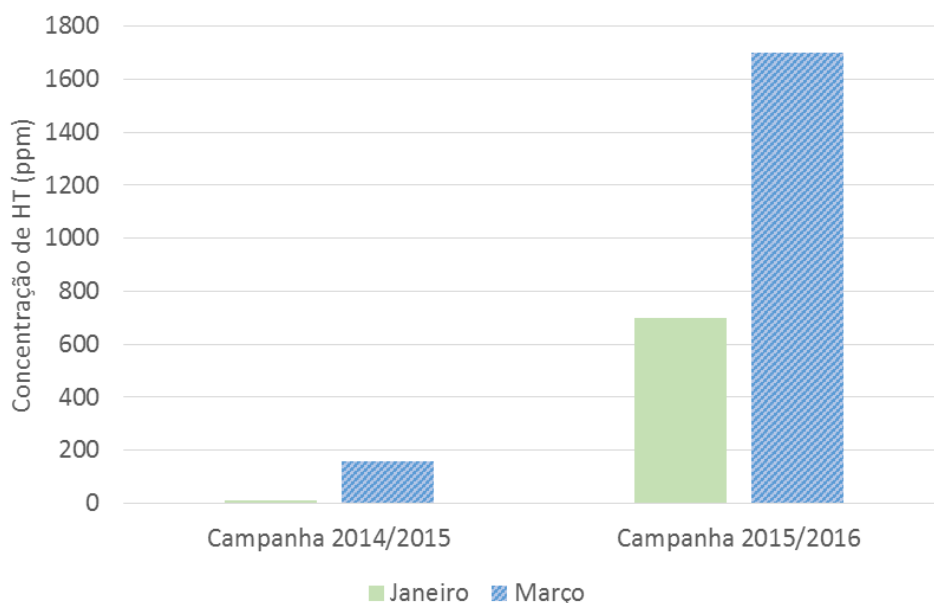


**Figura 4.1-** Concentração de HT em mg/kg (ppm) de extratos obtidos a partir de bagaços referentes à campanha de 2014/2015 da AZAL (●) e UCASUL (Δ). As extrações foram efetuadas utilizando 20 g de bagaço e 13 ml de água durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Como se pode observar, a quantidade de HT foi aumentando ao longo do tempo para ambos os bagaços, não se tendo no entanto atingido os valores de referência de 1700 ppm. Observa-se também que o bagaço da UCASUL apresentou sempre valores de concentração em HT superiores ao bagaço da AZAL.

Colocou-se a hipótese de esta diferença se dever à forma de armazenamento do bagaço que é feito na UCASUL (piscinas de baixa profundidade que permitem uma grande exposição do bagaço ao ar, bem como uma boa homogeneização do mesmo) e na AZAL (tegões altos, cuja geometria impede a exposição direta ao ar de grande parte do bagaço e provoca uma distribuição heterogénea, principalmente da fase aquosa). Assim, transferiu-se uma parte do bagaço da AZAL do tegão para um reboque ao ar com o intuito de simular as condições de armazenamento utilizadas na UCASUL. A evolução da concentração de HT deste bagaço armazenado em reboque foi também seguida durante algum tempo. Os resultados apresentados na secção 3.1, tabela 3.1, não foram no entanto conclusivos, devido a oscilações significativas dos valores de concentração em HT. Estas oscilações foram possivelmente originadas por variações no teor de água do bagaço, que no reboque rapidamente secava, tendo que ser frequentemente molhado com água. Verificou-se que embora as condições de armazenamento possam ter alguma influência na evolução da concentração de HT no bagaço, uma vez que o bagaço da UCASUL apresentou sempre uma maior concentração em HT, todos os bagaços relativos à campanha 2014/2015 estudados apresentaram um valor bastante abaixo do esperado. Este facto acabou por ser atribuído a uma fraca campanha de azeite que ocorreu em 2014/2015, devido às condições climáticas, à mosca do mediterrâneo e ao fungo “gafa”. Esta hipótese ganhou força depois de uma análise realizada no âmbito desta tese de mestrado ao bagaço da AZAL referente à campanha 2015/2016 na qual se determinou uma concentração em HT de 700 ppm logo em

Janeiro e 1600 ppm em Março. A diferença da concentração de HT no bagaço da AZAL entre as campanhas de 2014/2015 e 2015/2016 é muito significativa, como se pode observar na figura 4.2.



**Figura 4.2-** Concentração de HT em mg/kg (ppm) de extratos obtidos a partir de bagaços referentes à campanha de 2014/2015 e 2015/2016 recolhidos na empresa AZAL em Janeiro e Março. As extrações foram efetuadas utilizando 20 g de bagaço e 13 ml de água durante 1 hora, à temperatura ambiente.

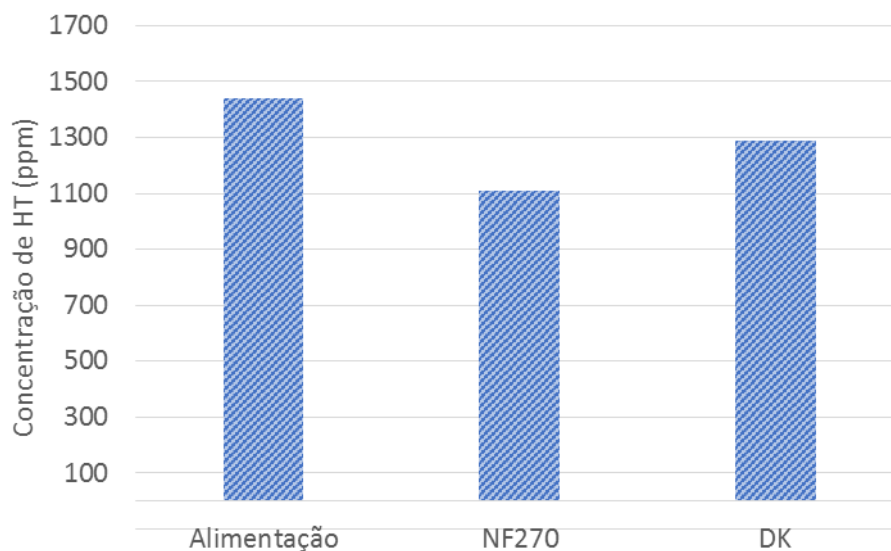
O baixo teor em HT verificado nos bagaços referentes à campanha de 2014/2015 afetou a qualidade final dos extratos que tiveram assim que ser submetidos a um processo de evaporação adicional, que para além do composto de interesse, o HT, concentrou também outros compostos como o ácido acético, cresol ou 4-etilfenol, afetando a qualidade do extrato.

#### 4.1.2 Produtividade do processo: tecnologia de nanofiltração

Os extratos naturais de HT estudados nesta tese foram produzidos por um processo tecnológico patenteado [2]. A produção industrial nas instalações da AZAL foi iniciada em Janeiro de 2015, utilizando o bagaço da campanha 2014/2015. Como ficou demonstrado na secção anterior, devido a uma fraca campanha 2014/2015 os teores em HT do bagaço de azeitona foram muito abaixo dos teores esperados, pelo que toda a produtividade do processo foi afetada.

A implementação industrial do processo foi no entanto bem-sucedida, tendo-se determinado ser o passo limitante do processo, o passo de nanofiltração. Com o intuito de aumentar a produtividade do passo de nanofiltração foram efetuados no âmbito desta tese, ensaios à escala laboratorial utilizando o bagaço UCASUL 2013/2014 (com elevado teor em HT) e diferentes membranas (NF270 versus DK) para investigar se seria possível aumentar o fluxo deste passo, sem afetar consideravelmente a concentração em HT. A membrana NF270 possui uma massa molar de corte

maior de 200-400 Da em comparação com a membrana DK que possui uma massa molar de corte de 150-300 Da. Os ensaios foram realizados de acordo com os métodos descritos na secção 2.2.2. Os resultados estão apresentados na secção 3.2 e ilustrados na figura 4.3.



**Figura 4.3-** Comparação de concentração de HT em mg/kg (ppm) da alimentação ao processo de nanofiltração e permeados obtidos utilizando membranas com diferentes massas molares de corte, NF270 (200-400 Da) e DK (150-300 Da).

Verifica-se que a realização do processo de extração do bagaço numa escala de quilogramas, nas instalações descritas na secção 2.2.2, afetou sensivelmente a concentração da alimentação, que passou dos usuais 1700 ppm para pouco mais de 1400 ppm. Relativamente à utilização da membrana NF270 com massa molar de corte de 200-400 Da, observou-se que permitiu praticamente dobrar o fluxo do passo de nanofiltração, sem afetar consideravelmente a concentração em HT do permeado (ver gráficos de permeabilidade hidráulica na secção 3.2). Deve no entanto, ter-se em consideração que o passo seguinte de osmose inversa a que foi submetido o permeado da membrana NF270 não foi efetuado com sucesso, tendo-se concentrado o extrato apenas 2 vezes (ver resultado na secção 3.3, tabela 3.3). A principal razão para não se ter evaporado mais o concentrado de osmose inversa está relacionado com o aquecimento da instalação e impossibilidade de utilizar um permutador de calor, mas é necessário aferir no futuro, se o facto de se ter aumentado a massa molar de corte da membrana não afeta negativamente o passo de concentração, devido à existência de outros compostos maiores no permeado.

#### 4.1.3 Armazenamento de concentrado de osmose inversa

Os concentrados de osmose inversa RO5, RO6, RO7 e RO8 (ver secção 2.1.2) provenientes do processo de osmose inversa foram fornecidos pela empresa AZAL. Com base nas tabelas 3.7, 3.8, 3.9 e 3.10 que apresentam a quantificação de HT feita segundo o método 2.2.4 é possível

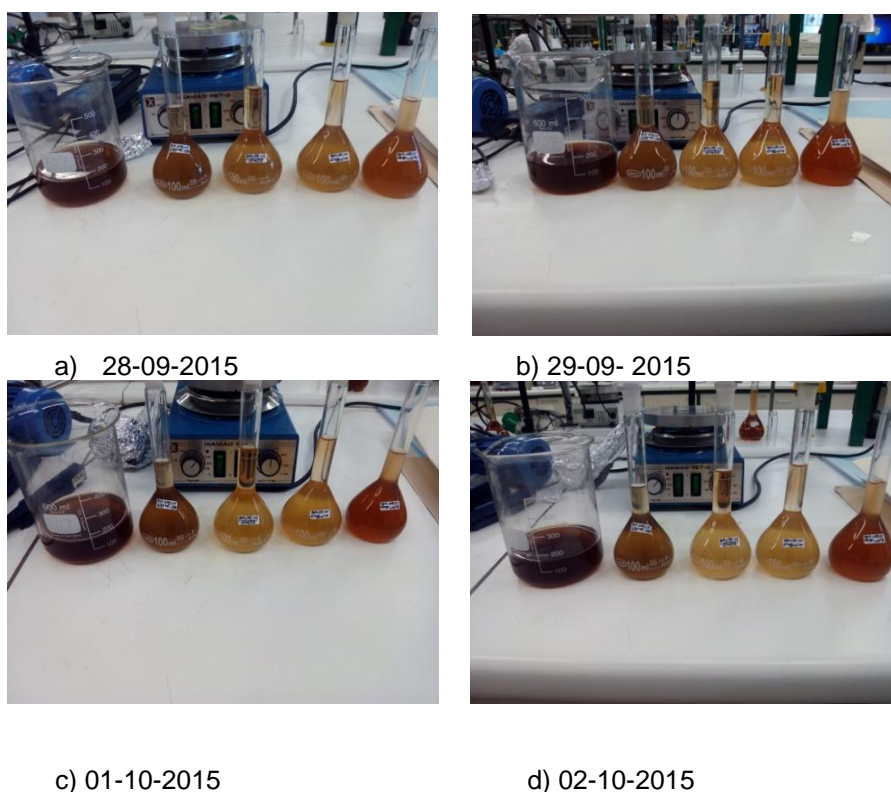


observar que todos os concentrados têm concentrações em HT diferentes, o que se deve ao facto de terem sido produzidos a condições diferentes. A produção destes concentrados está fora do âmbito desta dissertação, pelo que se optou por utilizar o concentrado mais recente, o RO8, que apesar de ser o mais pobre, é também o mais desafiante dos quatro para se atingir o objetivo de pelo menos 5 mg de HT, Ty e derivados/ 20 g de azeite, segundo a EFSA [3].

Um outro ensaio feito neste trabalho foi a evolução dos concentrados RO5, RO7 e RO8, com e sem ácido cítrico, por estes concentrados se revelarem muito sensíveis à temperatura. Para tal este ensaio foi preparado segundo o método 2.2.5.

Para o RO5, e segundo a figura 3.8, é possível observar que não houve alterações na cor significativas nas diversas amostras, pelo que a adição de ácido cítrico não mascarou qualquer escurecimento da amostra ao longo do tempo.

Relativamente ao RO7, e com base na figura 3.9 no item a) a primeira observação que se faz é que todas as amostras alteraram a cor, mas foi no momento da preparação. No item b) a primeira, segunda e quinta amostras escureceram, enquanto que a terceira e quarta pareceram ficar mais nítidas. Mais em pormenor, a figura 4.4 destaca os dias das principais alterações.



**Figura 4.4-** a) Soluções de concentrado de osmose inversa RO7 no dia 28-09-15; b) Soluções de concentrado de osmose inversa RO7 no dia 29-09-15; c) Soluções de concentrado de osmose inversa RO7 no dia 01-10-15; d) Soluções de concentrado de osmose inversa RO7 no dia 02-10-2015.

Com base na figura 4.4 é possível observar que do dia 28-09-2015 (item a)) para o dia 29-09-2015 (item b)) ocorreu um escurecimento significativo da primeira segunda e quinta amostras. Do dia

01-10-2015 (item c)) para o dia 02-10-2015 (item d)) observou-se que a terceira e quarta amostras pareceram ficar mais nítidas e até aclararam significativamente.

Após o estudo da evolução da cor do concentrado de osmose inversa RO7, a terceira e quarta amostras pareceram ser as que mais se adequavam por permanecerem mais claras.

No que diz respeito às diversas amostras de concentrado de osmose inversa RO8, preparadas segundo o método 2.2.5, a figura 3.10 apresenta a sua evolução ao longo do tempo. Com base na imagem é possível observar que houve um ligeiro escurecimento das amostras seguidas no final do mês do estudo.

Relativamente aos concentrados evaporados, foram estudadas diversas amostras preparadas segundo o método 2.2.6.1 e colocadas em diversas condições conforme o método 2.2.6.3.

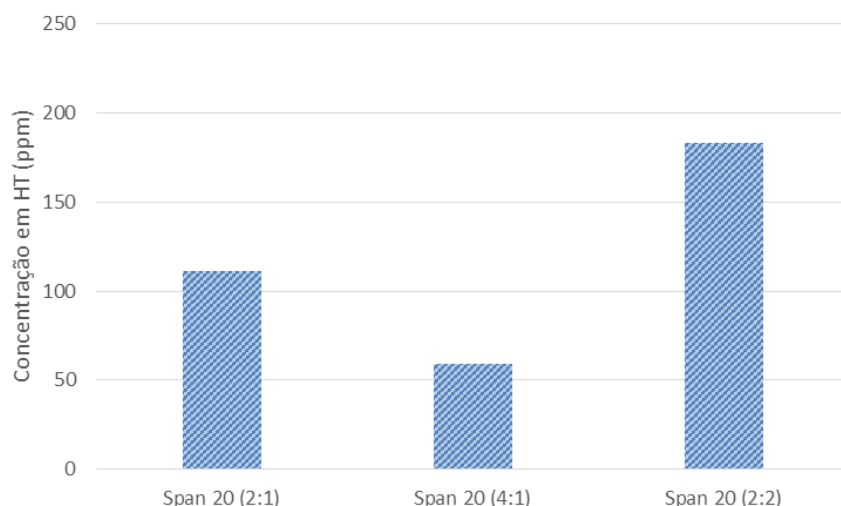
Com base na figura 3.12 é possível observar que na fase final do estudo a cor entre as várias amostras não é distinguível, não sendo crucial a forma como é armazenado. Uma nota interessante neste ensaio é que se cheirou inicialmente as amostras e não houve nenhuma amostra que se distinguisse das outras por ter um odor menos intenso, nem mesmo no final do estudo, a não ser que de uma forma geral o cheiro se intensificou significativamente a longo do tempo.

## **4.2 Azeite enriquecido em hidroxitirosol**

### **4.2.1 Incorporação de concentrado de osmose inversa em azeite**

Os concentrados de osmose inversa naturais ricos em HT, produzidos pelo processo descrito na secção 2.2.3 a partir de bagaço da AZAL campanha 2014/2015, foram concentrados por evaporação e aditivados a um azeite comercial. O facto de estarmos perante um concentrado de osmose inversa aquoso dificulta a sua incorporação numa matriz lipídica, tendo-se por esse motivo testado a utilização de diferentes emulsionantes. Os azeites preparados e emulsionantes testados estão apresentados na secção 3.6.1, tabela 3.22. O método de preparação dos vários azeites está detalhadamente descrito na secção 2.2.11.

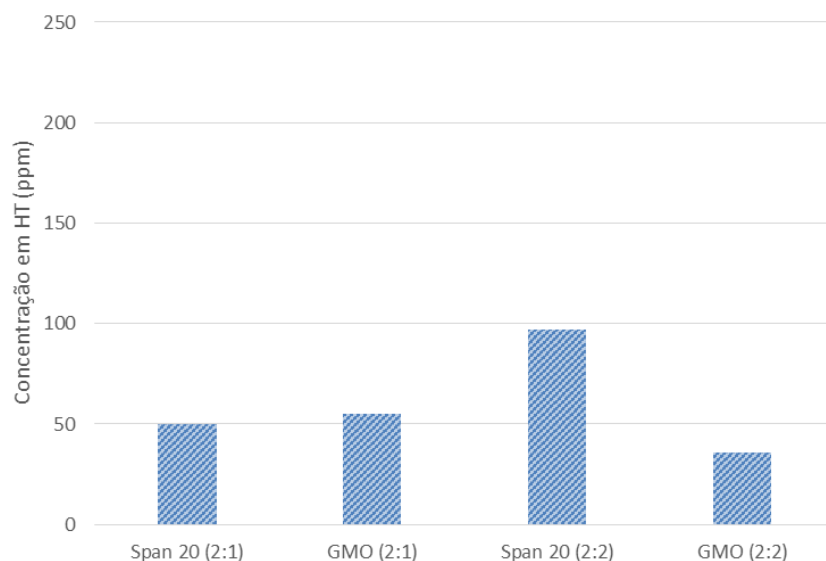
De acordo com Polychniatou et al. [4] , testou-se a eficácia do Span 20 para a incorporação de um concentrado de osmose inversa (RO5 e RO8, ver secção 2.1.2) evaporado 10 vezes, com aproximadamente 22000 ppm de HT. As análises aos azeites foram efetuadas cerca de 5 dias após a incorporação e apesar de em nenhum dos casos se ter evitado a precipitação do extrato, uma quantidade significativa de HT foi incorporado no azeite, como se pode observar pelos resultados apresentados na figura 4.5.



**Figura 4.5-** Concentração de HT em mg/kg (ppm) de azeites preparados por incorporação de concentrado de osmose inversa evaporado (C88) utilizando como emulsionante span 20 em diferentes razões mássicas emulsionante:concentrado de osmose inversa.

Observa-se que a partir de uma certa quantidade de emulsionante, ou seja, o aumento da quantidade de emulsionante, não traduz uma melhoria na eficácia da incorporação do concentrado de osmose inversa. Por outro lado, aumentando a quantidade de concentrado de osmose inversa, isto é passando de uma razão emulsionante/concentrado de 2:1 para 2:2, a quantidade de HT incorporada aumenta, mas a percentagem de incorporação diminui ligeiramente de 50% para 40%. Assim, embora no final se obtenha um azeite mais rico, existe um desperdício elevado de HT.

Experimentou-se ainda outro tipo de emulsionante o GMO, com o intuito de alcançar melhores percentagens de incorporação. Neste lote de experiências utilizou-se o mesmo concentrado, mas evaporado 20 vezes e assim com bastante mais HT que o utilizado anteriormente. Inesperadamente, os resultados foram bastante piores que os alcançados anteriormente com um concentrado de osmose inversa menos evaporado. Os resultados estão apresentados na figura 4.6.



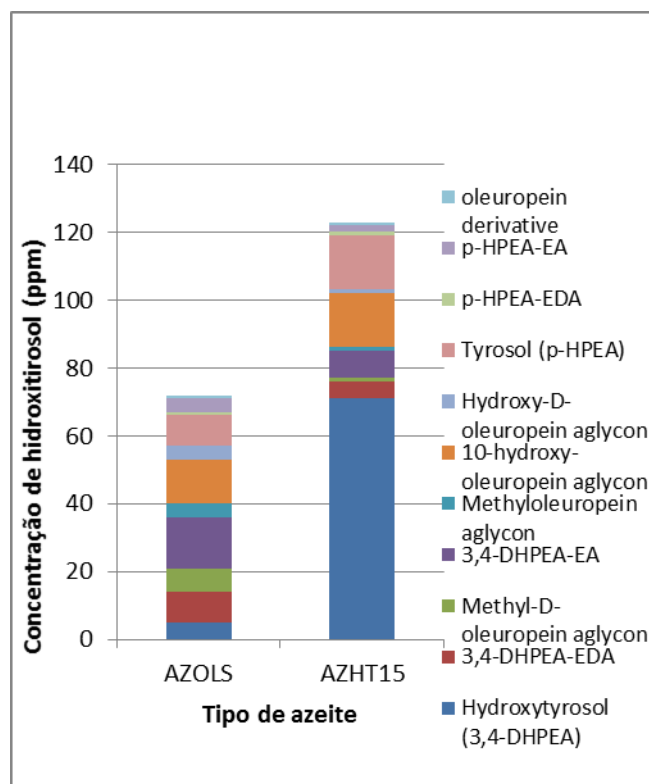
**Figura 4.6-** Concentração de HT em mg/kg (ppm) de azeites preparados por incorporação de concentrado de osmose inversa (C823) utilizando como emulsionante span 20 e GMO em diferentes razões mássicas emulsionante:concentrado de osmose inversa.

A concentração final dos azeites em HT é bastante inferior à alcançada em experiências anteriores para as quais se utilizou um evaporado apenas 10 vezes. As duas principais razões para estes resultados são, a possibilidade de haver precipitação não visível de HT no concentrado de osmose inversa aquoso ou em alternativa ser necessário a existência de uma determinada quantidade de água no azeite para que se consiga incorporar o HT. Para além disso, o GMO como emulsionante não demonstrou ser mais eficaz que o Span 20.

#### **4.2.2 Incorporação do evaporados sem utilização de emulsionantes: Quantificação de HT livre e HT total**

Tendo em conta que a utilização de emulsionantes não evitou a precipitação de uma significativa parte do concentrado de osmose inversa, decidiu-se explorar a possibilidade de efetuar a incorporação do concentrado de osmose inversa em azeite, sem adição de qualquer emulsionante. O método de preparação destes azeites está detalhadamente descrito na secção 3.6.1, tabela 3.21. O primeiro azeite (AZHT15) foi preparado no dia 10 de Setembro de 2015. Incorporou-se no azeite um concentrado de osmose inversa, evaporado com cerca de 25000 ppm de HT, utilizando uma proporção de 1%(m/m) de concentrado em azeite. Após 36 dias da sua preparação, o azeite foi extraído e analisado por HPLC-MS na Faculdade de Farmácia de Lisboa. Os principais compostos identificados e quantificados foram o hidroxitirosol (HT= 3,4-DHPEA) e o tirosol (TY=p-HPEA) e os seus derivados, constituídos pelas formas conjugadas de HT e TY com o ácido elenólico (3,4-DHPEA-EA, p-HPEA-EA) e com a forma dialdeídica do ácido elenólico (3,4-

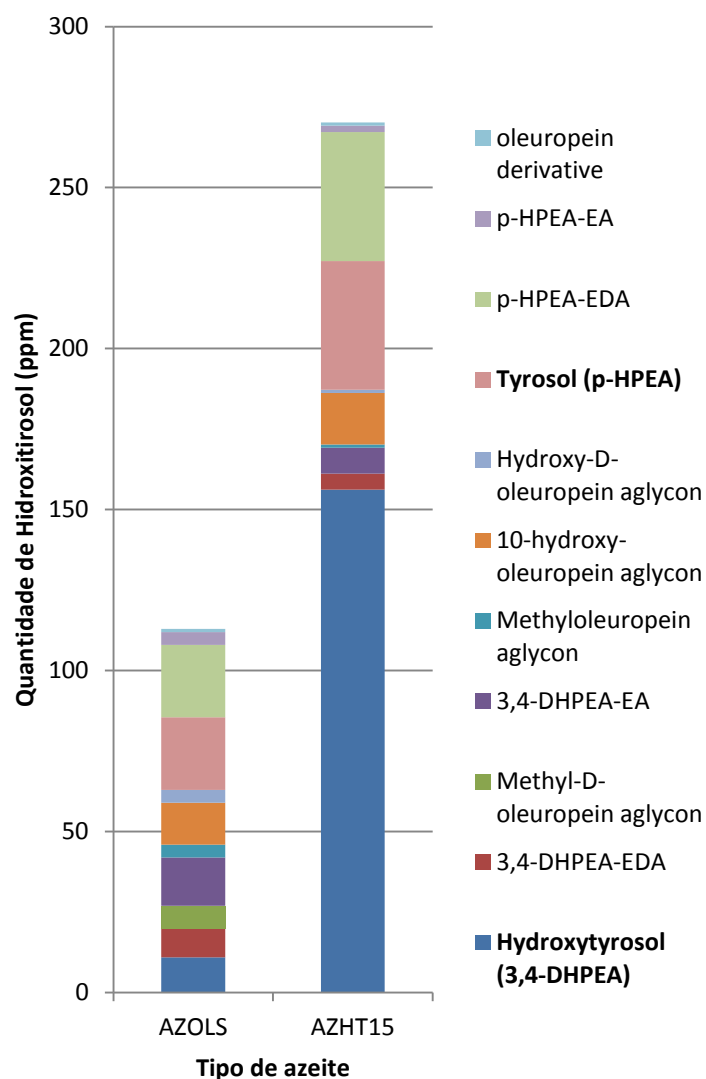
DHPEA-EDA, p-HPEA-EDA). A esta família de compostos dá-se o nome de secoridóides. A quantidade destes compostos presentes nos dois azeites está representada na figura 4.7.



**Figura 4.7-** Concentração em mg/kg (ppm) de hidroxitirosol, tirosol e compostos derivados num azeite comercial e no mesmo azeite comercial aditivado por incorporação de 1% (m/m) de um extrato natural concentrado (C59) sem utilização de emulsionantes.

Verifica-se que a quantidade de HT livre no azeite comercial (AZOLS) é muito baixa, ao contrário do azeite aditivado (AZHT15) que contém aproximadamente 15 vezes mais HT livre. Por outro lado, os compostos derivados de HT e Ty diminuem ligeiramente no azeite aditivado provavelmente devido a reações de hidrólise com a água adicionada.

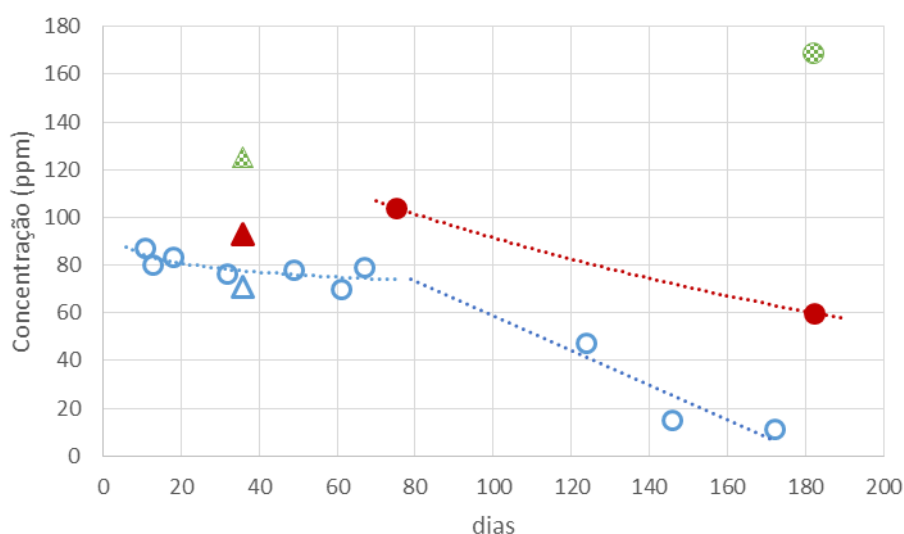
A recomendação da EFSA relativa à ingestão diária de 5 mg de polifenóis da azeitona e seus derivados, não tem em conta a diferença de massas molares entre HT (154 g/mol), Ty (138 g/mol) e os respetivos compostos derivados que são muito mais pesados (em média 346 g/mol). Desta forma, é essencial ter em consideração, o equivalente em mol de HT em vez da massa. De acordo com as correções propostas por Mastralexi et al. [5], tendo em consideração esta diferença significativa entre as massas molares, é necessário multiplicar a massa de HT por um fator de 2,2 e de Ty por um fator de 2,5. As concentrações corrigidas de HT, Ty e derivados presentes nos azeites em estudo estão apresentadas na figura 4.8.



**Figura 4.8-** Concentrações corrigidas em mg/kg (ppm) de hidroxitirosol, tirosol e compostos derivados num azeite comercial e no mesmo azeite comercial aditivado por incorporação de 1% (m/m) de um extrato natural concentrado (C59) sem utilização de emulsionantes.

Como se pode observar a correção introduzida permite que o valor de HT, Ty e compostos derivados atinga as quantidades necessárias para utilizar a alegação de saúde aceite pela EFSA para o azeite. Pelo contrário o azeite não aditivado está ainda bastante abaixo dos valores necessários.

O azeite aditivado em estudo (AZHT15) foi ainda seguido ao longo de 7 meses, através da monitorização da quantidade de HT livre, determinada por HPLC-UV no laboratório de análises do REQUIMTE (secção 3.6.2, tabela 3.24). Para além do HT livre, efetuou-se ainda a determinação de HT total por hidrólise ácida dos seus derivados (secção 3.6.4, tabela 3.33). Os resultados foram comparados com os obtidos pela Faculdade de Farmácia e estão apresentados na figura 4.9.



**Figura 4.9-** Concentração em mg/kg (ppm) para o azeite aditivado (AZHT15). HT livre: símbolos vazios azuis, HT e compostos derivados: símbolos cheios vermelhos, HT+ Ty e compostos derivados: símbolos com padrão verdes. Os símbolos em forma de triângulo representam medidas feitas por HPLC-MS na Faculdade de Farmácia. Os círculos representam medidas feitas por HPLC-UV no laboratório de análises do REQUIMTE. O azeite aditivado foi preparado por incorporação de 1% (m/m) de um extrato natural concentrado (C59) sem utilização de emulsionantes.

A figura 4.9 mostra que após uma decantação inicial de parte do extrato, a quantidade de HT livre permaneceu praticamente constante até aproximadamente ao dia 70. A concentração de HT de sensivelmente 80 ppm, corresponde a uma percentagem de incorporação de aproximadamente 30%. Quando se retomaram as análises no dia 124 (este intervalo de tempo sem análises ficou a dever-se a uma avaria no aparelho de HPLC), a concentração de HT livre estava já a decair. Este decaimento deve ter tido origem em nova precipitação que ocorreu à volta do dia 90.

Quando se compara o HT livre determinado por HPLC-MS na Faculdade de Farmácia medido no dia 36) com o valor de HT livre determinado por HPLC-UV no laboratório do REQUIMTE (entre os dias 10-70), observa-se que as medidas estão bastante coerentes especificamente no que diz respeito a este composto. Já quando se fizeram análises ao HT total (livre + compostos derivados), as medidas realizadas na Faculdade de Farmácia apresentam valores um pouco abaixo do determinado no laboratório REQUIMTE. Esta discrepância pode ser interpretada pelo facto de apenas alguns derivados, os mais conhecidos terem sido quantificados por HPLC-MS na Faculdade de Farmácia. Já no laboratório de análises do REQUIMTE, a análise ao HT total é feita utilizando o método de hidrólise ácida dos compostos derivados e subsequente quantificação de HT livre. Neste último caso, todas as moléculas derivadas de HT poderão estar a ser quantificadas e não apenas aquelas reportadas na bibliografia e mais conhecidas. Ao longo do tempo, embora se tenham apenas duas análises para o HT total, confirma-se o decaimento deste valor, embora de uma forma não tão acentuada como se verifica para o HT livre. Estas diferentes intensidades de decaimento pode significar que é de facto o HT livre que está a desaparecer de forma mais acelerada ao longo do tempo, em oposição aos compostos derivados que se mantêm no azeite

durante mais tempo. Para a análise ao HT total efetuada já na parte final desta tese (dia 182), quantificou-se para além de HT e seus derivados, também o Ty e seus derivados, que totalizaram uma concentração de 170 ppm. Este valor é muito discrepante ao determinado anteriormente por HPLC-MS na Faculdade de Farmácia e necessita de ser confirmado em trabalho futuro. No entanto, e se se confirmar este valor, verifica-se que existem muitos compostos derivados tanto de HT como de Ty, que não estão a ser contabilizados por HPLC-MS. Todas as concentrações apresentadas neste gráfico dizem respeito às concentrações reais determinadas e não foram ainda multiplicadas pelos fatores de correção de massas molares, determinados por Mastralexi et al. [5] e que são utilizados apenas para efeitos da alegação de saúde da EFSA.

#### 4.2.3 Otimização e armazenamento em azeites aditivados

Com o objetivo de obter a melhor incorporação de evaporado no azeite base procedeu-se ao estudo de otimização testando várias condições diferentes de incorporação, segundo o método 2.2.11. Os azeites aditivados testados foram o AZHT81t20, AZHT811, AZHT 812, AZHT813 e AHT814 (ver tabela 3.21). Todos os azeites à exceção do AZHT814 foram incorporados com auxílio do instrumento *Turrax* (IKA), enquanto que o AZHT814 foi preparado com auxílio de uma varinha mágica tradicional (Bosch) como se pode ver na tabela 3.38. A quantificação de HT livre feita nestes azeites aditivados foi feita através do método 2.2.12.

Com base na tabela 3.40 é possível registar que todos os azeites aditivados revelaram ser pobres em HT, o que poderá ser explicado pelo facto de o azeite base em que foi incorporado o evaporado ser um azeite não filtrado, o que possui ainda quantidades consideráveis de água, que faz com que o HT se dissolva na água e não permaneça no azeite. Relativamente aos azeites aditivados preparados com o auxílio do instrumento *Turrax* o AZHT811 revelou ter a melhor incorporação, pelo que o fator tempo é crucial durante a incorporação, pois o AZHT81t20 cuja incorporação foi feita durante 20 minutos revelou ser mais pobre em HT que o AZHT811( tempo de incorporação 10min). Em relação ao AZHT812 cuja incorporação durou 1 min, não se podem observar muitas diferenças pelo que terá de se avaliar estas condições no futuro.

Quanto às rotações utilizadas pelo instrumento, também afetam a incorporação, sendo que uma rotação baixa/média (AZHT813) possivelmente não é suficiente para incorporar o evaporado, pelo que a melhor forma será na rotação máxima (AZHT811).

No que diz respeito à incorporação *Turrax* vs. Varinha mágica (AZHT811 vs. AZHT814) observa-se que a varinha não permite a incorporação satisfatória do evaporado no azeite, pelo que o *Turrax* se torna o instrumento ideal para este tipo de preparações.

Ainda relativamente ao instrumento, mediu-se a temperatura de incorporação no azeites aditivados. Através da tabela 3.39, que apresenta as temperaturas medidas durante a incorporação, é possível observar que o *Turrax* provoca um aquecimento relativamente elevado do azeite no momento da incorporação, o que faz com o que o azeite se deteriore e escureça.

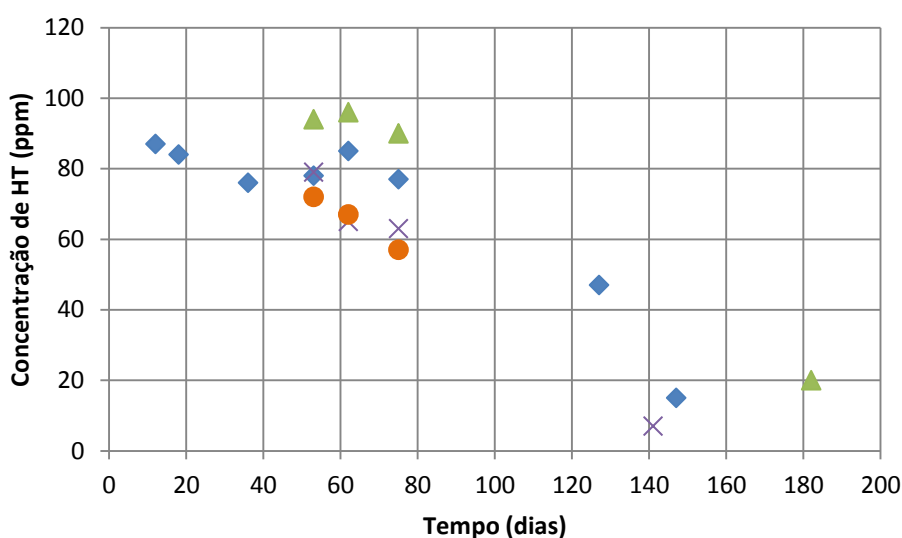
Outra otimização procedida foi a repetição da incorporação feita no AZHT15. Reproduziram-se quatro azeites de modo semelhante ao AZHT15, segundo o método 2.2.11. Os azeites aditivados



em questão são o AZHT15A, AZHT81, AZHT82 e AZHT83 (ver tabela 3.21) foram quantificados segundo o método 2.2.12.

Os resultados da quantificação de HT podem ser vistos na tabela 3.27. Como o evaporado do AZHT15A foi preparado com o concentrado de osmose inversa RO5 (o mesmo que o AZHT15) é possível registrar que obteve valores muito idênticos, pelo que a reprodução foi feita com sucesso. Relativamente aos outros três azeites aditivados (AZHT81, AZHT82 e AZHT83) a incorporação partiu de um concentrado de osmose inversa mais pobre, o RO8 em relação ao RO5, tendo também, através da tabela 3.27, observado valores satisfatórios e coerentes com o azeite aditivado AZHT15. É possível, também, observar que entre estes três azeites aditivados, procedeu-se a uma análise inicial que revelou uma quantidade mais elevada de HT, pelo que é normal uma vez que nos azeites aditivados testados ocorre uma precipitação inicial que estanca ao fim de ~1 semana, permanecendo constante durante ~3 meses, e a partir desse instante possivelmente ocorre nova precipitação que faz com que haja uma perda do restante HT.

A figura 4.10 apresenta a evolução de algumas repetições do azeite aditivado AZHT 15.



**Figura 4.10-** Evolução das repetições do azeite aditivado AZHT15 comparativamente ao próprio AZHT15. Legenda: Quadrado azul- AZHT15; triângulo verde- AZHT81; cruz roxa: AZHT82 bola laranja: AZHT83.

É possível observar através da figura 4.10 que todos os azeites seguiram o mesmo comportamento do azeite AZHT15, pelo que se poderá dizer que as repetições foram feitas com sucesso. A razão de o AZHT15A não estar presente nesta figura é que apenas possui duas análises iniciais, não sendo possível avaliar a sua evolução.

Outra forma de otimização ensaiada ao longo deste trabalho foi a incorporação de várias quantidades de evaporados, com o fim de entender a quantidade ótima a ser incorporada ao azeite base. Para tal preparam-se vários azeites aditivados, tais como AZHT16, AZHT81, AZHT18CsemH<sub>2</sub>O, AZHT88, AZHT810, AZHT815 e AZHT816 (ver tabela 3.21) segundo o método 2.2.11. A quantificação de HT foi feita segundo o método 2.2.12

Segundo a tabela 3.37, é possível observar que entre os azeites aditivados AZHT16 e AZHT81, que apesar de serem incorporados com concentrados de osmose inversa diferentes, as quantidades de HT foram muito semelhantes, e perto do azeite de referência AZHT15.

Em relação aos azeites aditivados AZHT81 e AZHT88, cujas incorporações diferem na quantidade adicionada de evaporado, ou seja, o objetivo de adicionar apenas a quantidade necessária de HT suficiente para que não ocorra precipitação e para que o azeite contenha uma quantidade de HT que ronde os 80 ppm (AZHT88) não foi o suficiente, pelo que se tem de adicionar sempre mais (pelo menos 1%), pois a precipitação é inevitável e faz com que o HT precipite.

Outros dois azeites aditivados que diferem apenas na quantidade adicionada são os AZHT815 e AZHT816. Com base na tabela 3.37 é possível registrar que o azeite com maior quantidade adicionada de evaporado é mais rico em HT, reforçando a ideia expressa anteriormente. A diferença entre estes dois azeites e os azeites AZHT81 e AZHT88 é que a incorporação dos evaporados foi diferente. Quanto maior a evaporação, menor será a quantidade de HT que permanece no azeite, possivelmente pela razão de o HT estar a precipitar e não ser possível observar.

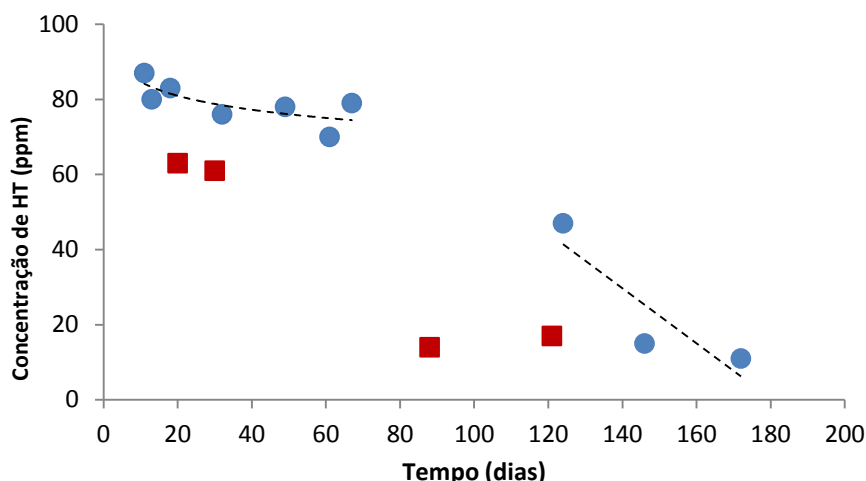
No que diz respeito aos azeites aditivados AZHT81 e AZHT810 que diferem apenas no tipo de evaporação feita, é possível observar pela tabela 3.37 que quanto mais concentrado for o evaporado, haverá possivelmente uma maior precipitação, uma vez que há uma maior perda de HT, pelo que evaporar mais o concentrado de osmose inversa não será resultado de uma melhor incorporação.

Também os azeites aditivados AZHT81 e AZHT18CsemH<sub>2</sub>O foram incorporados da mesma forma, mas com o tipo de evaporação diferente. O AZHT18CsemH<sub>2</sub>O, segundo a tabela 3.37, revelou ser mais pobre relativamente ao AZHT81, uma vez que o evaporado foi levado à secura, e quanto mais evaporado for o concentrado de osmose inversa, menor será incorporação de HT no azeite.

Relativamente aos azeites aditivados AZHT810 e AZHT815, que apenas diferem no tipo de azeite base utilizado na incorporação, é possível observar pela tabela 3.37 que o azeite AZAL BIO (ver secção 2.1.3) é mais rico em HT comparativamente ao AZOLS (Azeite Oliveira da Serra), mas com base no que já foi dito anteriormente o azeite Bio é um azeite não filtrado e possui bastante água, o que fará com que o HT possivelmente se perca muito rápido em análises futuras em relação ao azeite aditivado com AZOLS.

Com o objetivo de testar as condições de armazenamento de azeites aditivados procedeu-se ao estudo com dois azeites aditivados. O primeiro foi o azeite aditivado AZHT15 (ver tabela 3.21), preparado segundo o método 2.2.11. Parte desse azeite aditivado foi previamente colocado no frigorífico, para avaliar as condições de armazenamento mais adequadas, comparativamente com o azeite colocado à temperatura e ao ar.

A quantificação do AZHT15 e AZHT15 no frigorífico, feita segundo o método 2.2.12, pode ser observada na figura 4.11.



**Figura 4.11-** Evolução de HT livre do azeite aditivado AZHT15 na condição de armazenamento à luz e ao ar (série azul) e no frigorífico (série vermelha).

Através da figura 4.11 é possível observar que a melhor condição de armazenamento relativamente a estas duas última referidas é à luz e à temperatura ambiente, uma vez que no frigorífico este azeite aditivado revelou sempre ser mais pobre a nível de HT livre.

O outro azeite estudado a nível de condições de armazenamento foi o azeite aditivado AZHT811 (ver tabela 3.21), preparado segundo o método 2.2.11.

Uma vez que não foi efetuada do mesmo modo a quantificação de HT que se fez para o azeite AZHT15, apenas se tirou uma fotografia para apreciar a melhor aparência entre as quatro situações diferentes. Segundo as figuras 3.15 e 3.16, secção 3.6.8 é possível observar que a melhor condição foi o azeite que esteve à luz e com árgon que escureceu menos ao longo do tempo de estudo, uma vez que o instrumento *Turrax* (IKA) faz com o que o próprio azeite escureça significativamente.

Outro azeite testado foi o AZHT816, mas em relação à turvação, preparado segundo o método 2.2.11.

Com base na figura 3.17 é possível observar a amostra que tem *molecular sieve* (imagem da esquerda) perdeu a turvação inicial (imagem da direita). relativamente à quantificação feita através do método 2.2.11, e com base na tabelas 3.36 e 3.41 é possível observar que a adição de *molecular sieve* faz com que o HT fique adsorvido nas partículas do sólido, sendo possível comentar que este não é um método eficaz para a eliminação da turvação.

### 4.3 Desodorização do concentrado de osmose inversa

Alguns dos azeites preparados nas secções anteriores foram submetidos a testes organoléticos na AZAL. Os resultados apontaram para um defeito que os provadores descreveram como “avinhado-avinagrado”. Posteriormente, uma análise de GC aos compostos voláteis existentes no extrato demonstrou a existência de uma grande quantidade de ácido acético, naturalmente o responsável

pelo defeito avinagrado. Para além de ácido acético detetou-se ainda a existência de 4-etilfenol e cresol. Os cromatogramas estão apresentados na secção 3.6.10. Nesta secção descrevem-se as soluções exploradas para eliminação destes compostos do concentrado de osmose inversa.


#### 4.3.1 Neutralização química

Numa primeira abordagem tentou-se neutralizar o ácido acético quimicamente com hidróxido de sódio, como descrito na secção 2.2.6.2. Utilizou-se um medidor de pH para seguir o processo. O pH inicial do concentrado de osmose inversa era de 4.45 e verificou-se ser muito difícil aumentar este valor, com o concentrado de osmose inversa a apresentar um comportamento similar ao de uma solução tampão. Ao longo do processo, o concentrado de osmose inversa foi passando de avinagrado para um cheiro intenso e desagradável com outras reações provavelmente a ocorrer, sendo que no final do processo, o produto tinha adquirido uma cor negra e tinha sido completamente degradado.

#### 4.3.2 Evaporação

A possibilidade de eliminar o ácido acético do concentrado de osmose inversa por evaporação foi explorada. Efetuaram-se várias evaporações do concentrado de osmose inversa a diferentes temperaturas. As evaporações foram realizadas num evaporador rotativo ou em alternativa numa instalação de secagem, ambas sob vácuo. A tabela 4.1 apresenta um resumo das experiências efetuadas e dos resultados obtidos, bem como uma imagem da aparência dos vários concentrados após evaporação.

**Tabela 4.1-** Resumo das experiências de evaporação dos concentrados da osmose inversa evaporados realizadas a diferentes temperaturas.

Evaporados realizadas a diferentes temperaturas.						
Instalação	Evaporador Rotativo			Instalação de secagem		
Imagem das amostras após evaporação						
Código amostra	C812	C813	C814	C815	C817	C818
Temperatura	35°C	60°C	80°C	80°C	80°C	80°C
Tempo	-	-	-	overnight	overnight	overnight
Resultado	Nenhuma das experiências foi efetiva na eliminação do odor avinagrado. Verifica-se que o odor se agrava à medida que se aumenta a			Produto degradado	Produto degradado	Produto degradado

	temperatura.			
--	--------------	--	--	--

Foram realizadas três experiências de evaporação no evaporador rotativo a diferentes temperaturas, 35°C, 60°C e 80°C. Depois de concentrados, o odor a vinagrado dos concentrados de osmose inversa parece piorar com o aumento da temperatura. Nenhuma das experiências foi eficaz na eliminação do odor, tendo ficado no entanto evidente a suscetibilidade do concentrado de osmose inversa à temperatura. Quando foram deixados a evaporar durante a noite num banho a 80°C, os extratos C815, C817 e C818, adquiriram uma cor negra e com um odor que passou de vinagrado a um cheiro muito intenso e desagradável. O concentrado de osmose inversa ficou degradado.

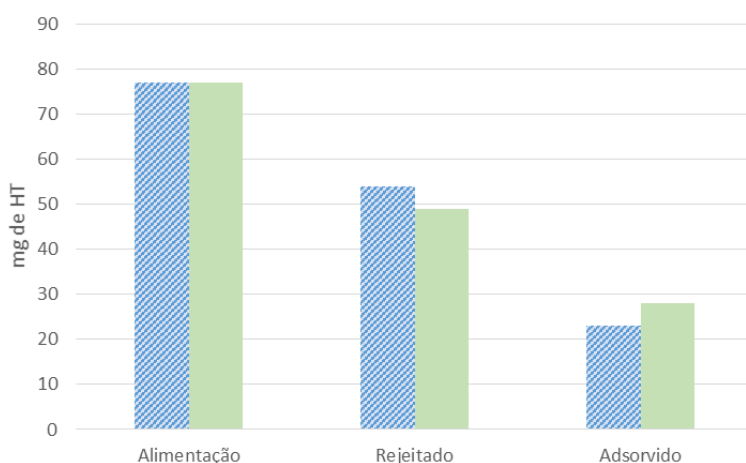
### 4.3.3 Pervaporação

Outra estratégia explorada para a eliminação do ácido acético do concentrado de osmose inversa foi a tecnologia de pervaporação. Os ensaios foram efetuados pelo grupo de tecnologia de membranas da FCT-UNL, mas os resultados analisados e interpretados no âmbito desta dissertação de mestrado. Realizaram-se dois ensaios de pervaporação, tendo o retentado sido analisado por HPLC para quantificação de HT livre. Os resultados estão apresentados na tabela 3.12 da secção 3.5.2.3. Os ensaios foram realizados durante 5 horas, tendo-se conseguido pervaporar à volta de 2 mL de uma alimentação de aproximadamente 20 mL. A alimentação consistiu em ambos os casos do concentrado da osmose inversa evaporado, ou seja com uma concentração em HT de aproximadamente 22000 ppm. Em ambas as experiências não houve perdas de HT para o pervaporado. Também não se observaram diferenças significativas relativamente ao odor do evaporado. Ainda assim, prepararam-se três azeites com o objetivo de avaliar se se notariam diferenças de odor no produto final. Com os concentrados pervaporados foram preparados três azeites aditivados. A tabela 3.43 da secção 3.6.9.2 apresenta a quantificação de HT e Ty livres por HPLC para esses azeites. Todos os azeites foram feitos no mesmo dia para fins comparativos. O AZHT822 (60,5 ppm) foi um azeite aditivado com o evaporado antes da pervaporação. Os outros AZHT823 (56 ppm), AZHT824 (44 ppm) e AZHT825 (63 ppm) foram incorporados com evaporados que tinham sido submetidos a pervaporação (retentados). As análises demonstram que todos os azeites têm um teor em HT bastante abaixo do pretendido. Para além disso, o resultado das provas continuou a dar um odor bastante forte a vinagrado.

### 4.3.4 Adsorção com resina XAD4

Uma vez que a eliminação do odor do concentrado mostrou ser ineficaz quer por evaporação, quer por pervaporação, optou-se por uma estratégia de purificação do hidroxitirosol existente no

concentrado. Começou por se experimentar a adsorção em diferentes carvões ativados com o intuito de adsorver os compostos responsáveis pela cor e cheiro do concentrado. Os métodos utilizados e resultados obtidos estão descritos nas secções 2.2.9, 3.4.2 e 3.5.2.4 respetivamente. Os concentrados resultantes de adsorção em carvões perderam quase na totalidade a cor e cheiro, tendo no entanto também sido adsorvido o hidroxitirosol. Já para o caso de concentrados posteriormente evaporados (elevado teor em HT), os resultados demonstraram praticamente não existir adsorção de HT, no entanto também não perderam praticamente nem a cor nem o cheiro. A falta de seletividade dos carvões levou-nos a experimentar uma resina para adsorção do hidroxitirosol e posterior dessorção com um solvente adequado, o etanol. Este ensaio foi efetuado de acordo com um ensaio similar reportado na literatura por Zagklis et al. [6] e detalhadamente descrito na secção 2.2.10. O concentrado da osmose inversa (RO8) foi diretamente submetido ao processo de adsorção. Os resultados estão apresentados na secção 3.5.2.5, tabela 3.14 e ilustrados na figura 4.12.

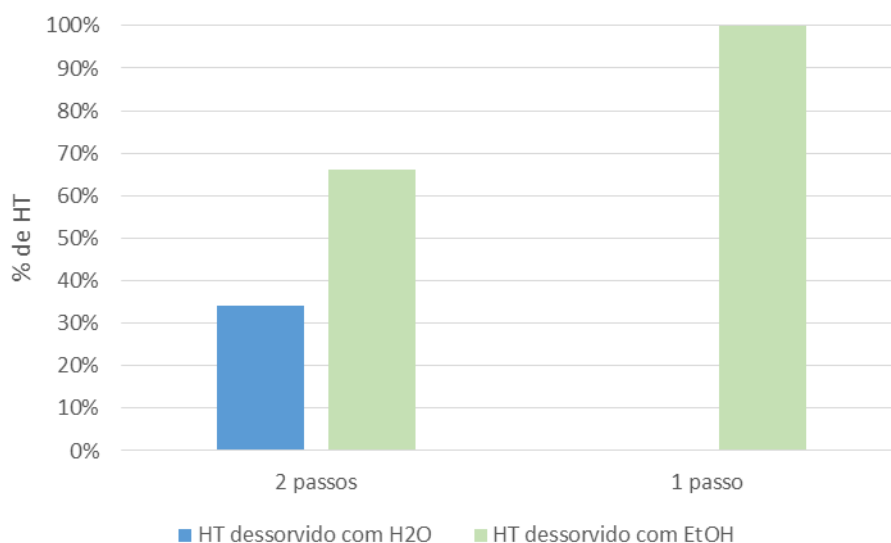


**Figura 4.12-** Resultados obtidos para duas experiências similares de adsorção. Massa total de HT (mg) na alimentação, massa total de HT (mg) no rejeitado e massa total de HT (mg) que foi adsorvido na resina. Para ambas os casos, a experiência realizou-se com 35 mL de alimentação (RO8), 120 g de resina/L extrato, durante 3 horas à temperatura ambiente.

De acordo com os resultados preliminares obtidos, pode observar-se que a maioria do HT (64-70%) existente no concentrado não foi adsorvido, tendo permanecido no “não adsorvido” (ou rejeitado). A quantidade de HT adsorvido (30-36%), foi posteriormente dessorvido. Uma análise ao odor do rejeitado e do adsorvido do processo, permitiu presumir que o ácido acético é também rejeitado pela resina, tendo este sido o primeiro indício de se estar a alcançar uma separação eficiente do ácido acético.

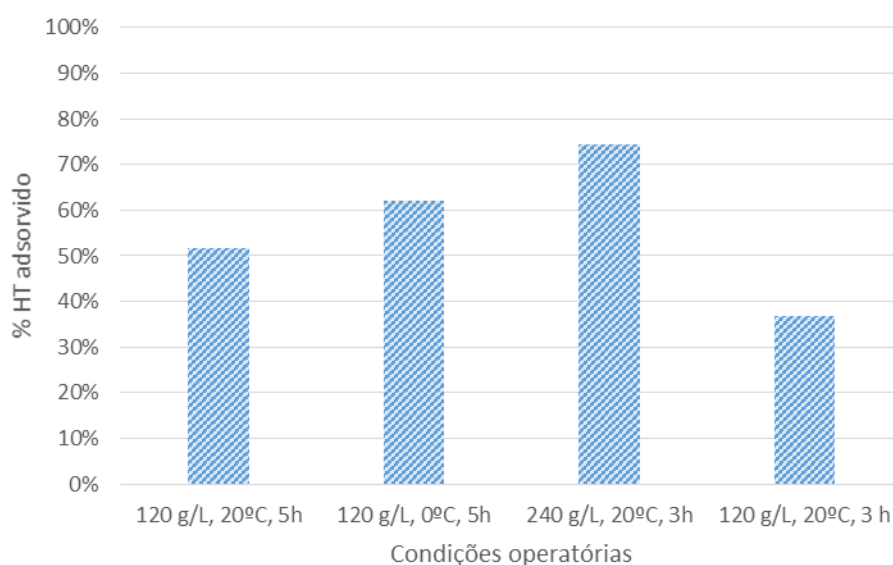
Experimentaram-se diferentes formas de dessorção do HT da resina: i) dessorção em dois passos, efetuando-se primeiro uma dessorção com água para retirar os hidratos de carbono, seguindo-se uma dessorção com etanol para recuperar o hidroxitirosol, ii) dessorção num único passo para recuperar diretamente o hidroxitirosol com etanol.

Os resultados estão apresentados na secção 3.5.2.5, tabela 3.15 e ilustrados na figura 4.13.



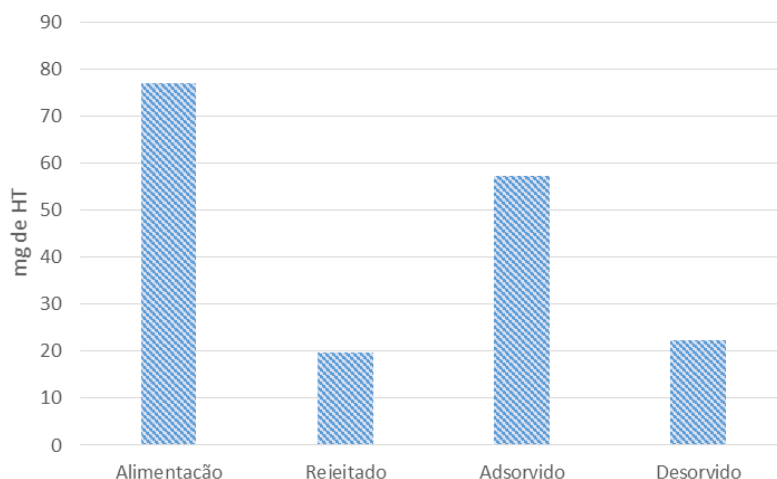
**Figura 4.13-** Percentagem de recuperação do HT adsorvido na resina utilizando diferentes métodos: i) dessorção em dois passos foi efetuada primeiro com água e depois com etanol, ii) dessorção apenas num passo foi efetuada apenas com etanol. A experiência de dessorção foram ambas realizadas utilizando 35 mL de solvente durante 3 horas à temperatura ambiente.

Observa-se que o passo de dessorção apenas com etanol foi eficaz na remoção da totalidade do HT adsorvido na resina. Quando se efetua a dessorção em dois passos, perde-se algum HT (11%) no primeiro passo de dessorção com a água. Procedeu-se de seguida a um estudo de otimização com o objetivo de aumentar a percentagem de HT adsorvido na resina, utilizando diferentes quantidades de resina, diferentes temperaturas e diferentes tempos de adsorção. Os resultados estão apresentados na secção 3.5.2.5, tabela 3.16 e ilustrados na figura 4.14.



**Figura 4.14-** Otimização do passo de adsorção de HT na resina, utilizando diferentes quantidades de resina, diferentes temperaturas e diferentes tempos de adsorção.

Verificou-se que a diminuição da temperatura aumentou a percentagem de HT adsorvida, o aumento do tempo de adsorção, aumentou a quantidade de HT adsorvida, mas o fator determinante foi o aumento da quantidade de resina que aumentou a percentagem de HT adsorvida até aos 74%. Procedeu-se assim a um ensaio completo de adsorção do concentrado da osmose inversa RO8, utilizando 240 g de resina por litro de alimentação. Os resultados estão apresentados na secção 3.5.2.5, tabela 3.17 e ilustrados na figura 4.15.

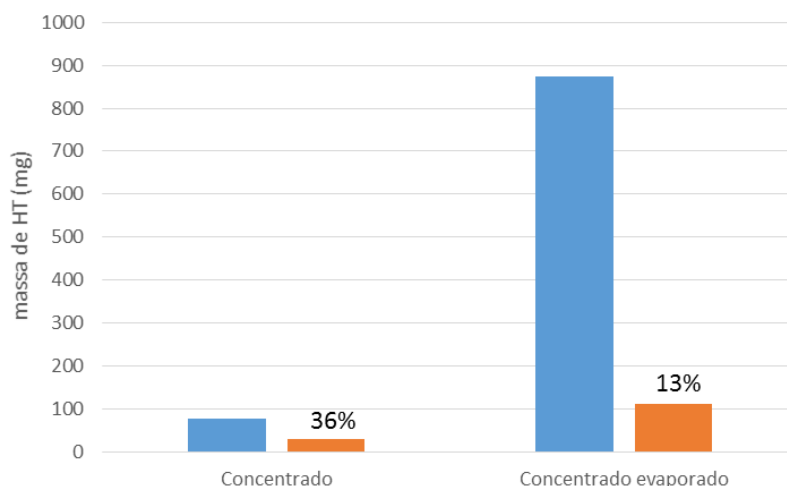


**Figura 4.15-** Massa total de HT (mg) na alimentação, massa total de HT (mg) no rejeitado e massa total de HT (mg) que foi adsorvido na resina. A experiência realizou-se com 35 mL de alimentação (RO8), 240 g/L de resina, durante 3 horas à temperatura ambiente. A dessorção de HT foi efetuada em dois passos com água e etanol.

Face à primeira experiência no qual se utilizaram 120g/L de resina, mais do que se duplicou a massa de HT adsorvida na resina. No caso desta última experiência, o passo que passou a ser menos eficiente foi o passo de dessorção, que para esta quantidade de HT provavelmente necessita de maior quantidade de solvente.

Este processo foi também aplicado ao concentrado da osmose inversa depois de evaporado e assim com uma concentração em HT 10 vezes superior. Esta possibilidade permitiria a adsorção a quantidades muito menores de líquido e assim diminuir a escala. Para uma concentração aproximadamente 10 vezes superior de HT, a percentagem adsorvida diminuiu de 36% para 13%. Os resultados estão apresentados na secção 3.2.5.2, tabela 3.18 e ilustrados na Figura 4.16.



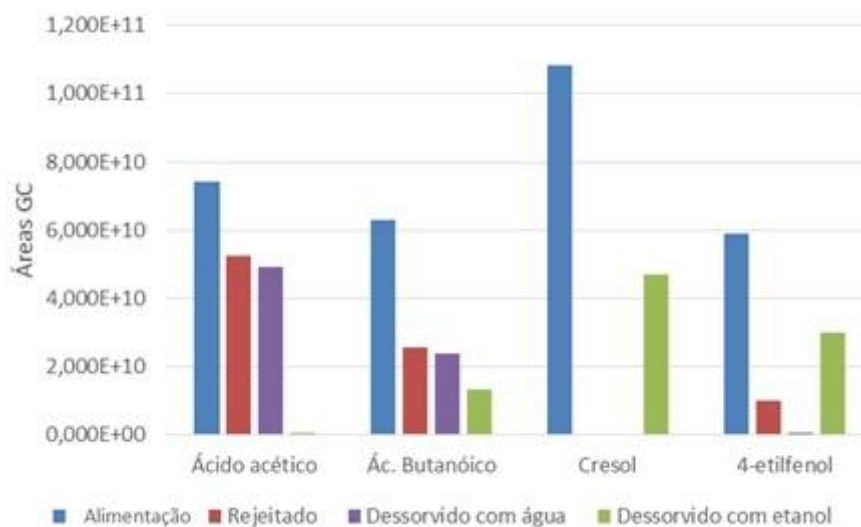


**Figura 4.16-** Comparação de ensaios de adsorção efetuados para o concentrado da osmose inversa e para o concentrado da osmose inversa evaporado com uma concentração em HT aproximadamente 10 vezes mais elevada. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições 35 mL de alimentação, 120g/L de resina, à temperatura ambiente durante 3 horas.

Os resultados obtidos mostram que o concentrado evaporado tem uma concentração demasiado elevada e embora tenham sido adsorvidos praticamente 100 mg de HT, esta quantidade corresponde a apenas 13% da quantidade de HT existente na alimentação. Desta forma, o aumento da concentração provocou uma diminuição drástica da eficiência do processo.

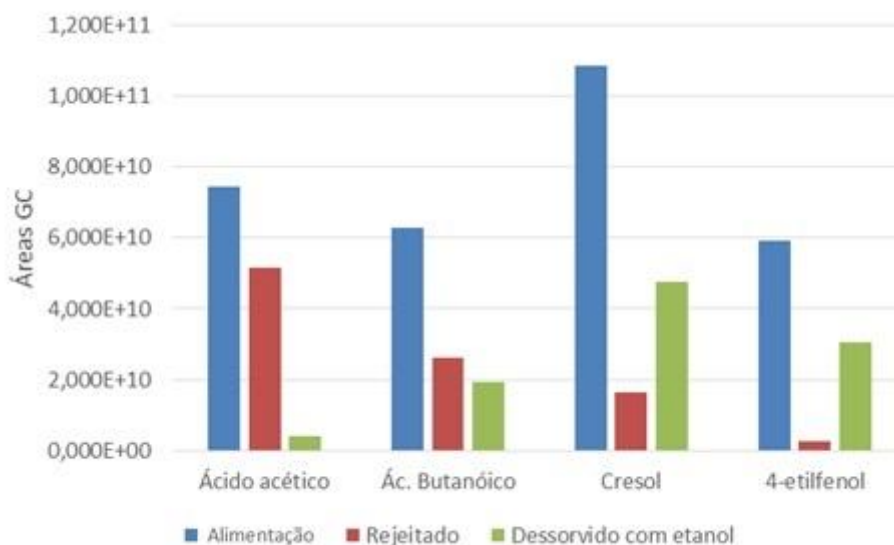
#### 4.3.5 Quantificação de ácido acético e outros voláteis

No contexto de eliminação do defeito avinagrado do concentrado de osmose inversa, analisou-se por GC a quantidade de ácido acético e outros voláteis entretanto identificados nomeadamente, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol, presentes no concentrado antes e depois do processo de adsorção na resina. Os resultados estão apresentados na secção 3.6.10 e as áreas dos picos podem ser consultadas no anexo C. As figuras 4.17 e 4.18 ilustram as quantidades relativas de cada um dos compostos voláteis presentes na alimentação, “não adsorvido” (ou rejeitado) e concentrado dessorvido da resina. A figura 4.17 refere-se ao processo em que a dessorção foi feita em dois passos, primeiro com água e depois com etanol.



**Figura 4.17-** Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanoico, creosol e 4-etilfenol na alimentação (azul), rejeitado (vermelho), extrato dessorvido com água (roxo) e extrato dessorvido com etanol (verde) Os ensaios foram realizados utilizando 35 mL de alimentação, 120 g/L de resina, à temperatura ambiente durante 3 horas. As dessorções efetuaram-se utilizando 35 mL de solvente.

A figura 4.18 refere-se ao processo em que a dessorção foi feita apenas num passo com etanol.



**Figura 4.18-** Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanoico, creosol e 4-etilfenol na alimentação (azul), rejeitado (vermelho) e concentrado dessorvido com etanol (verde) Os ensaios foram realizados utilizando 35 mL de alimentação, 120 g/L de resina, à temperatura ambiente durante 3 horas. A dessorção efetuou-se apenas num passo utilizando 35 ml de etanol.

Calcularam-se ainda com base nos resultados obtidos e tendo em consideração que o concentrado dessorvido com etanol foi evaporado 3,5 vezes antes de ser analisado, as percentagens de eliminação de cada um dos compostos nos extratos dessorvidos.

**Tabela 4.2-** Comparação da percentagem de recuperação de HT adsorvido na resina com a percentagem de eliminação de alguns dos compostos voláteis existentes no concentrado e identificados e quantificados por GC.

<b>Compostos voláteis</b>	<b>Recuperação de HT adsorvido</b>	<b>Ácido acético eliminado</b>	<b>Ác. Butanóico eliminado</b>	<b>Creosol eliminado</b>	<b>4-etilfenol Eliminado</b>
<b>RO8 dessorvido com água+ etanol</b>	38%	99%	79%	57%	49%
<b>RO8 dessorvido com etanol</b>	63%	94%	69%	56%	48%

Observa-se que o ácido acético é o composto volátil, cuja quantidade no extrato é mais afetado pelo processo de adsorção. O ácido acético é eliminado em 99% da sua quantidade inicial, quando a dessorção da resina é feita em dois passos (primeiro com água e depois com etanol). Por outro lado, o ácido butanóico também é significativamente eliminado em 79% da sua quantidade inicial. O creosol e o 4-etilfenol são os compostos para os quais o processo é menos efetivo. O passo de dessorção com água é benéfica tanto na eliminação do ácido acético como do ácido butanóico, pois uma parte destes compostos são dessorvidos com água. Já para o caso do creosol e 4-etilfenol, o facto de a dessorção ocorrer numa passo ou em dois passos não é relevante para o produto final. Este processo necessita ainda de ser sujeito a estudos de otimização principalmente na fase de dessorção. O passo de dessorção com água é importante para a eliminação do ácido acético e ácido butanóico, mas pode também dessorver algum HT, como nos mostraram alguns dos resultados apresentados na secção 4.3.4.

O concentrado dessorvido com etanol foi utilizado para preparação de um azeite (AZHT826) que foi também enviado para a AZAL. Desta vez os resultados dos testes organoléticos deram ainda um cheiro avinhado moderado, mas totalmente sem sabor.

Assim, o processo de adsorção provou uma elevada eficiência na separação de HT de outros compostos existentes no concentrado nomeadamente compostos voláteis como o ácido acético, responsável pelo cheiro/sabor a avinagrado.

Deve-se ter ainda em consideração que o concentrado obtido a partir do processo de dessorção, é um produto completamente diferente do concentrado utilizado para preparação do azeite AZHT15 e cujo teor em HT foi estudado ao longo de 7 meses.

## Bibliografia

- [1] H.K. Obied, D.R. Bedgood, P.D. Prenzler, K. Robards. Effect of Processing Conditions, prestorage treatment, and storage conditions on the phenol content and antioxidant activity of olive mill waste. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 3925-3932
- [2] M. Nunes da Ponte, J.L. C. Santos, A. Matias, A.V.M.Nunes, C.M.M. Duarte, J.G.Crespo. Method of obtaining a hydroxytyrosol-rich from olive tree residues and sub-products using clean technologies. US Patent: 8,066,998B2.
- [3] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No. 1924/2006. *EFSA J.* 2011, 9 (4), 1–25.
- [4] V. Polychniatou, C. Tzia. Study of Formulation and Stability of Co-surfactant Free Water-in-Olive Oil Nano- and Submicron Emulsions with Food Grade Non-ionic Surfactants. *Journal Am Oil Chem Soc.* 2014, 91, 79-88.
- [5] A. Mastralexi, N.Nenandis, M.Tsimidou, Addressing Analytical Requirements to Support Health Claims on "Olive Oil Polyphenols" (EC Regulation 432/2012). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2014, 62, 2459-2461.
- [6] D. Zaglikis, A. Vavouraki, M. Kornaros, C. Paraskeva. Purification of olive mill wastewater phenols through membrane filtration and resin adsorption/desorption. *Journal of Hazardous Materials.* 2015, 285, 69-76.



## 5 Conclusões

A principal conclusão deste trabalho é a da obtenção com sucesso dum azeite aditivado com hidroxitirosol, contendo o valor mínimo que satisfaz as condições impostas pela EFSA para autorizar a alegação de prevenção de doenças cardiovasculares. A inovação mais importante foi a descoberta dum método de dissolução dum concentrado aquoso de hidroxitirosol num azeite comercial, que permaneceu estável, durante pelo menos 3 meses, com uma elevada concentração de hidroxitirosol livre.

Para além deste desenvolvimento de produto, este trabalho permitiu também obter as seguintes conclusões adicionais:

Tendo sido utilizados bagaços de azeitona com origem em três campanhas sucessivas de colheita de azeitona, verificou-se uma dependência acentuada do conteúdo de hidroxitirosol total dos bagaços em relação aos factores climáticos e à consequente variação da qualidade de azeitonas e azeites. Em particular verificou-se que, tendo sido a campanha de 2014/15 pronunciadamente fraca em termos de produção e qualidade de azeitona e azeite, o bagaço apresentou quantidades anormalmente baixas de hidroxitirosol.

Os concentrados de hidroxitirosol obtidos por filtração a partir de bagaços contêm componentes que podem conferir defeitos aos azeites aditivados. O processo de remoção de defeitos que se revelou mais eficaz foi o de adsorção numa resina e posterior dessorção do hidroxitirosol com etanol.

Para trabalhos futuros sugere-se o aprofundamento do efeito do tipo de azeite no processo de incorporação do concentrado; o alargamento do presente estudo feito nesta dissertação a outro tipo de emulsionantes e optimização do passo de dessorção para a remoção do hidroxitirosol.







## Anexos

### Anexo A- Cromatogramas de HPLC-UV

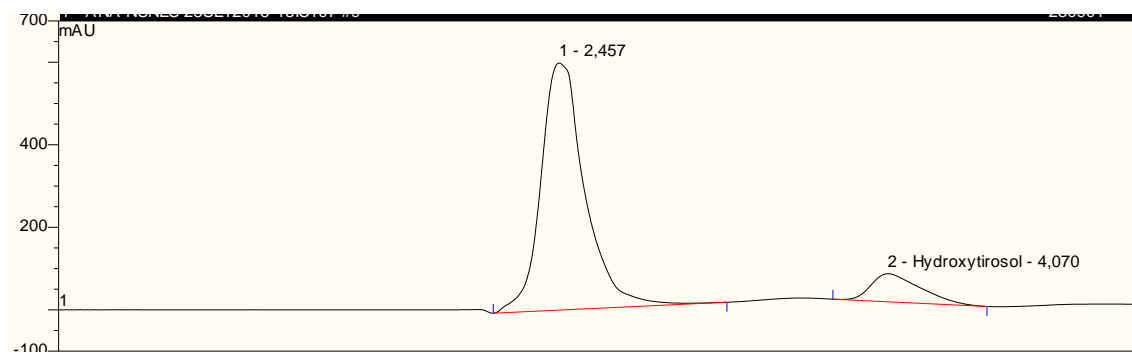


Figura A1- AZOLS 22-09-2015

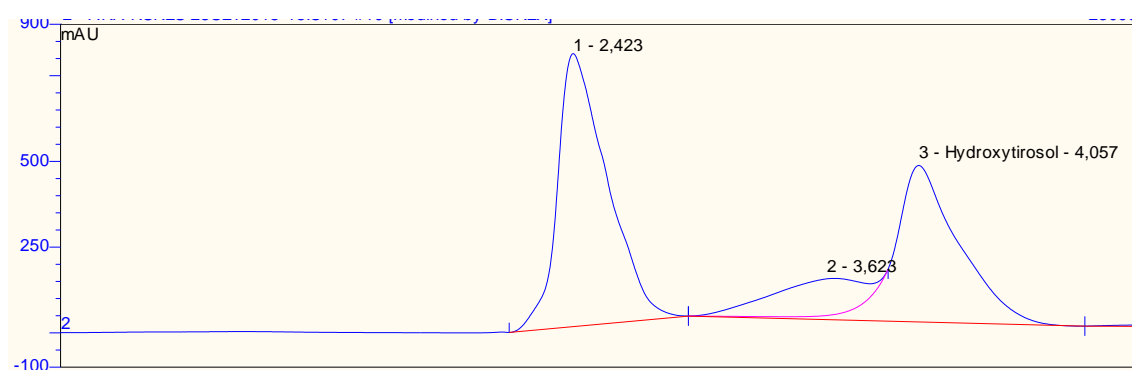


Figura A2-AZHT15 22-09-2015

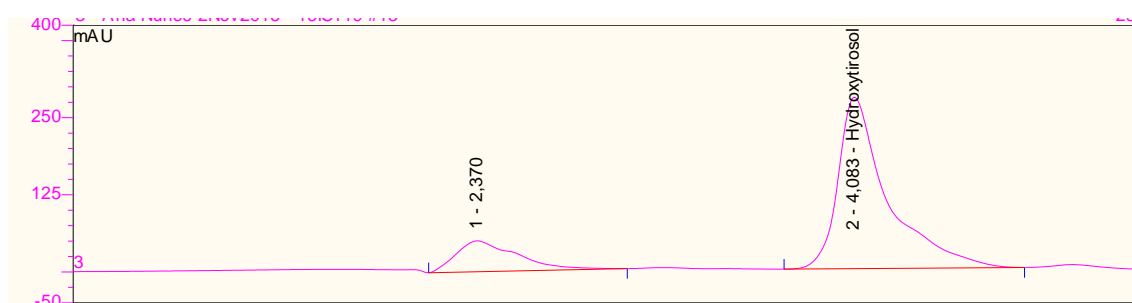


Figura A3-AZHT15 02-11-2015

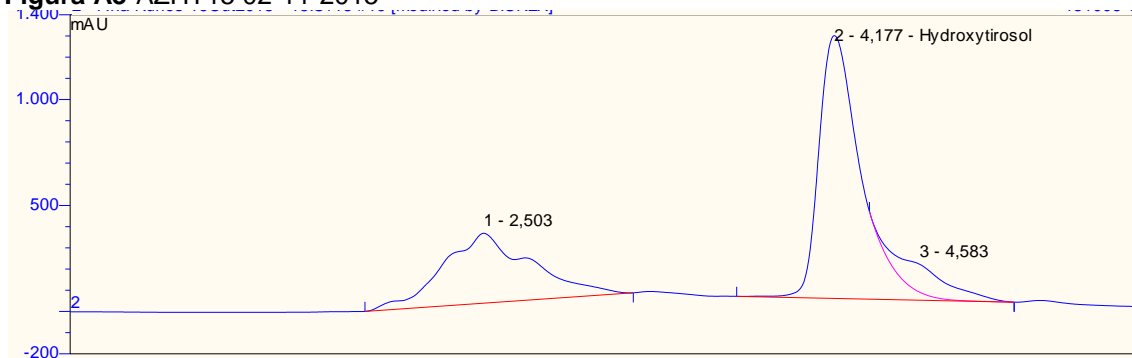
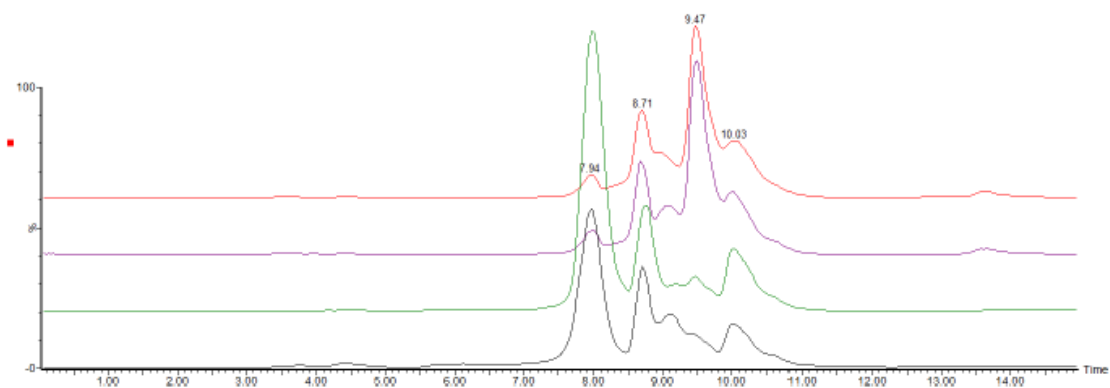


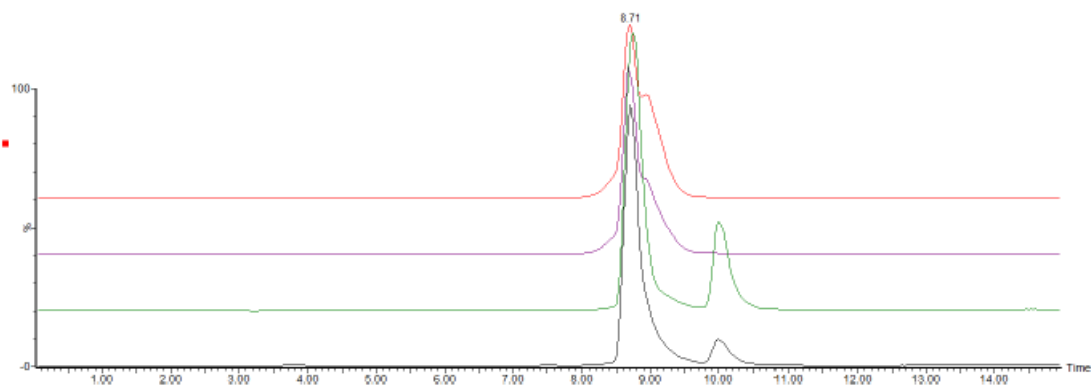
Figura A4- Bagaço UCASUL 16-10-2015



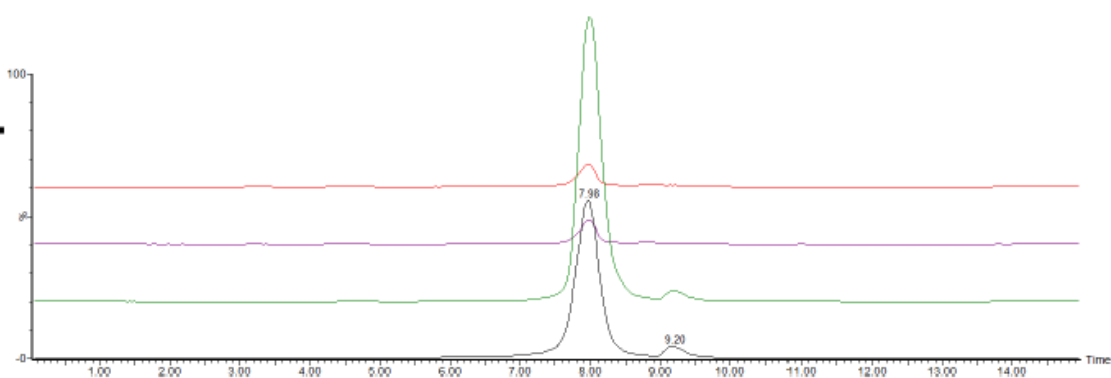
## Anexo B- Cromatogramas de HPLC-MS



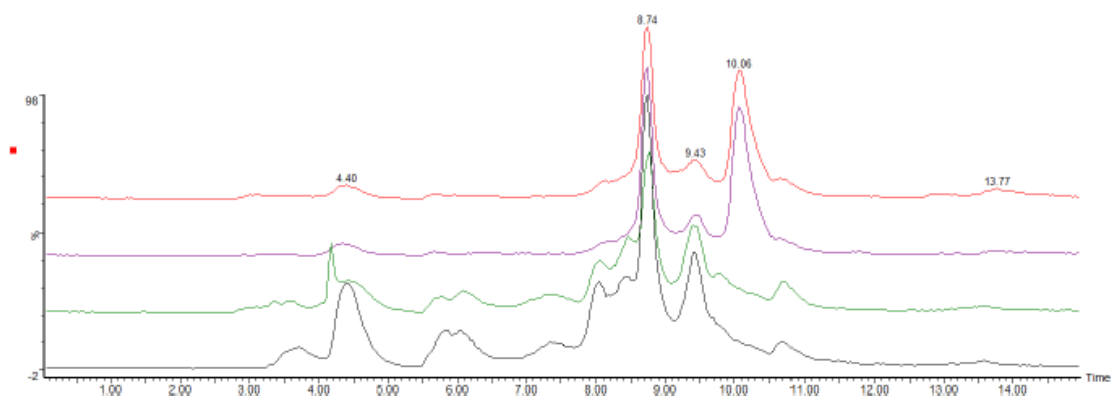
**Figura B1-** Cada cromatograma corresponde à soma das contribuições de todos os derivados de HT e Ty conhecidos (SIR 9 sinais). Legenda: AZHT15-1, AZHT15-2, AZOLS-1, AZOLS-2.



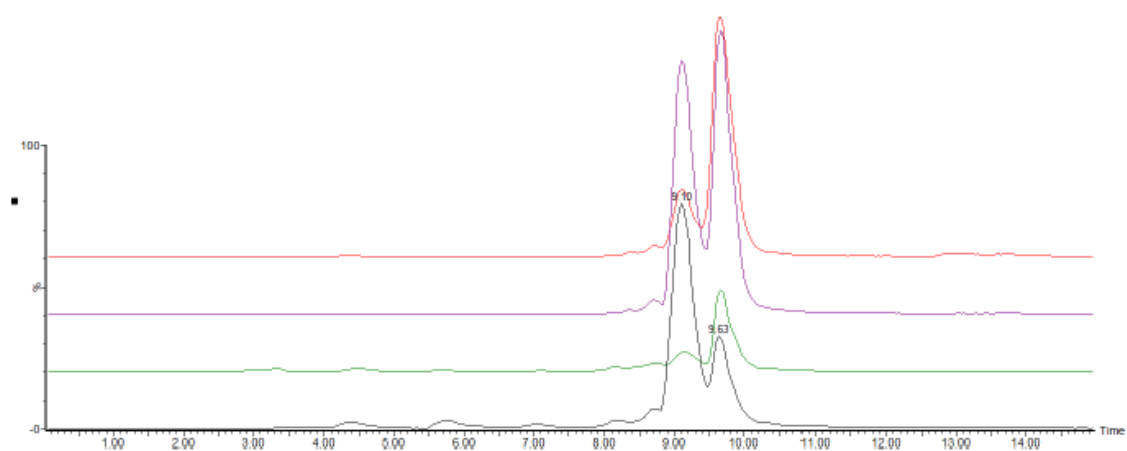
**Figura B2-** Tirosol (Ty) m/z 137.



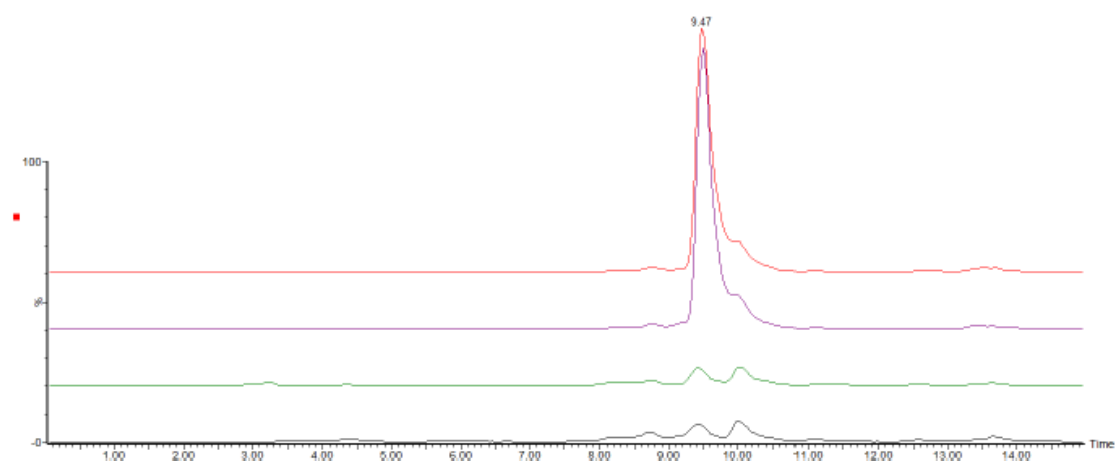
**Figura B3-** Hidroxitirosol (HT) m/z 153.



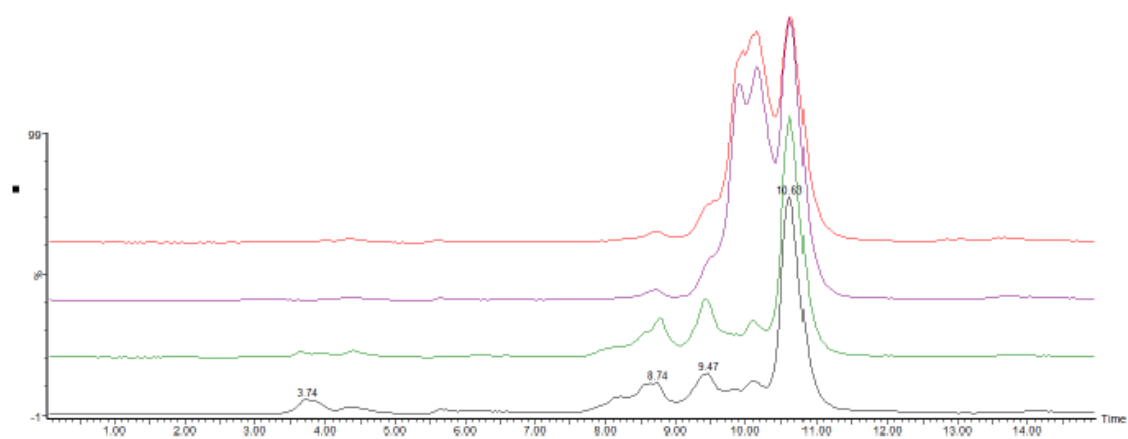
**Figura B4-** p-HPEA-EDA: derivado do Ty (m/z 303).



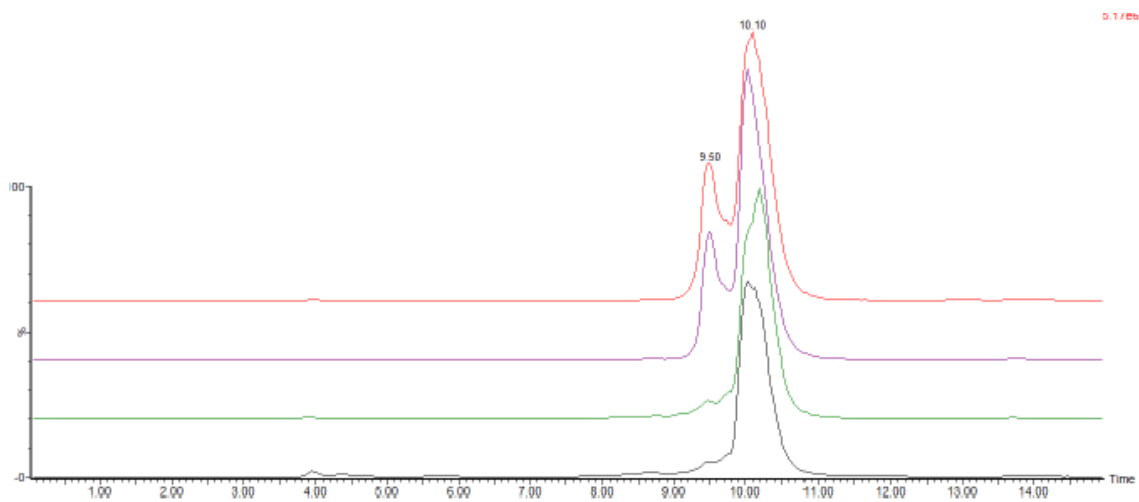
**Figura B5-** 3,4-DHPEA-EDA: derivado do HT (m/z 319).



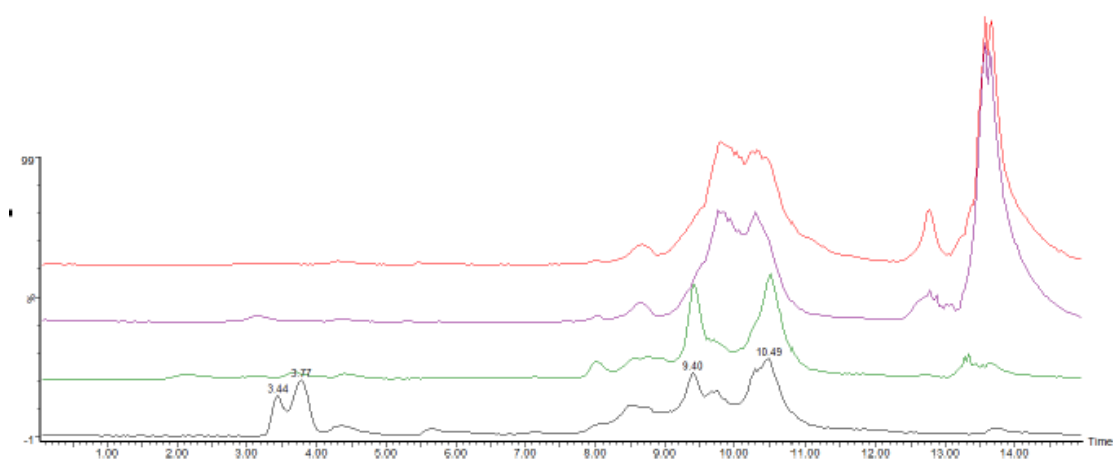
**Figura B6-** Metil D-aglicone oleuropeína: derivado do HT (m/z 333).



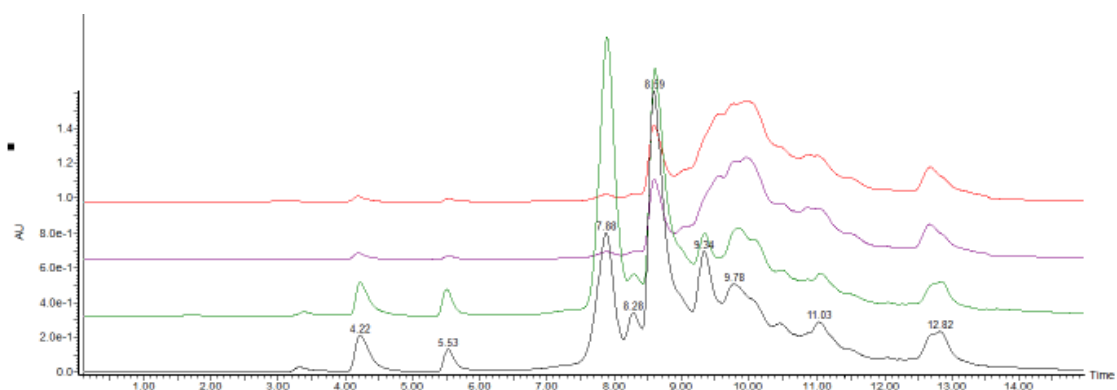
**Figura B7-** p-HPEA-EA: derivado do Ty (m/z 361).



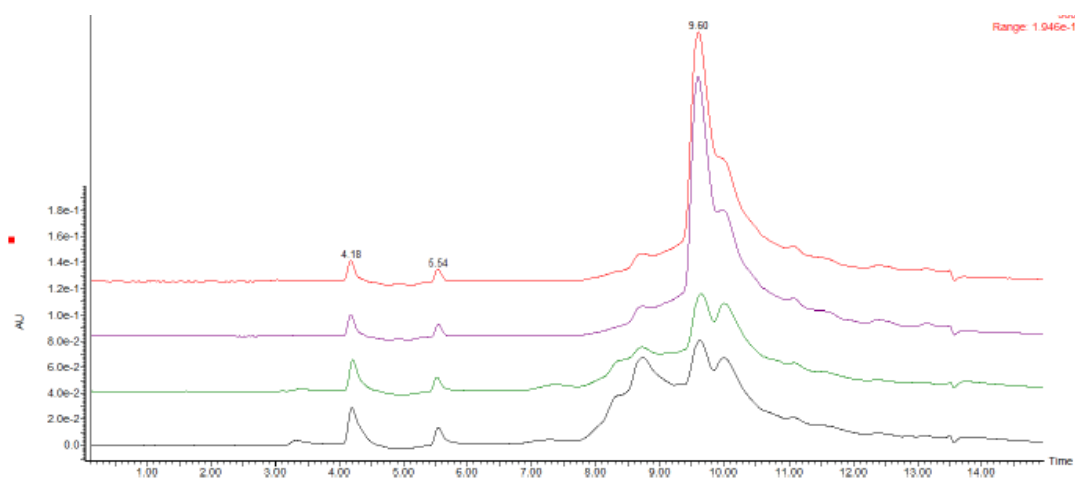
**Figura B8-** 3,4-DHPEA-EA: derivado do HT (m/z 377).



**Figura B9-** Metil aglicone oleuropeína: derivado do HT (m/z 391).



**Figura B10-** Cromatogramas das amostras a 280 nm (típico compostos fenólicos).



**Figura B11-** Cromatogramas das amostras a 360 nm (flavonoides).

## Anexo C- Área dos picos de GC

**Tabela C1-** área dos picos obtidos por GC para determinados compostos com maus odor detetados.

<b>Área dos picos em GC por <i>headspace</i></b>				
<b>Amostra</b>	<b>Compostos</b>			
	Ácido acético	Ácido butanóico	Creosol	4-etilfenol
<b>RO5 (03/02) Base</b>	8,421E+10	2,731E+10	5,147E+10	6,425E+10
<b>RO5 (21/09) Frigorífico</b>	9,104E+10	2,401E+10	1,103E+11	5,860E+10
<b>C511 (12/10) luz (100 para 20)</b>	1,421E+11	2,802E+10	3,926E+10	3,468E+10
<b>RO8 (3/02) (base)</b>	5,329E+10	4,794E+10	8,429E+10	4,540E+10
<b>RO8 (2/11) luz</b>	5,060E+10	4,428E+10	8,427E+10	4,482E+10
<b>RO8 (2/11) Frigorífico</b>	5,665E+10	4,713E+10	8,397E+10	4,115E+10
<b>C86 (2/11)</b>	1,809E+11	5,814E+10	1,669E+10	2,292E+10
<b>C87 (2/11)</b>	1,715E+11	5,804E+10	1,083E+10	2,166E+10
<b>C85 (2/11)</b>	1,306E+11	4,808E+10	8,765E+09	2,065E+10
<b>C811 (21/12)luz</b>	1,235E+11	4,756E+10	9,302E+09	2,122E+10
<b>C812 (11/1)luz</b>	8,129E+10	3,912E+10	1,471E+10	2,331E+10
<b>C820 (18/01) luz</b>	7,780E+10	3,660E+10	8,214E+09	1,285E+10
<b>C821 (19/01) escuro</b>	7,451E+10	4,149E+10	1,758E+10	1,934E+10
<b>AZHT824(04/02)</b>	7,143E+10	6,635E+09	9,508E+08	8,138E+08
<b>C826 (26/1) luz (100 para 10)</b>	1,687E+11	6,083E+10	1,091E+10	1,527E+10
<b>Cret 1 escuro</b>	1,413E+11	5,388E+10	7,974E+09	1,175E+10
<b>Cret2 escuro</b>	1,362E+11	5,189E+10	7,742E+09	1,229E+10
<b>C pervaporado</b>	2,282E+11	1,086E+11	1,024E+09	5,954E+10